

Funktionelle Charakterisierung der Arginin Methyltransferase PRMT6

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Chemie
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Dawin Michael Hyllus

aus Frankenthal/Pfalz

Marburg/Lahn, 2009

Vom Fachbereich Chemie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation
am 27.März 2009 angenommen.

Erstgutachter: Prof. Dr. Lars-Oliver Essen

Zweitgutachter: Prof. Dr. Uta-Maria Bauer

Tag der mündlichen Prüfung am 01. April 2009

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Protein Arginin Methyltransferasen (PRMT)	1
1.1.1	Posttranslationale Modifikation von Proteinen.....	1
1.1.2	Struktur der Protein Arginin Methyltransferasen.....	2
1.1.3	Mechanismus der Arginin Methylierung	5
1.1.4	Substrate und Funktionen der Protein Arginin Methyltransferasen.....	7
1.1.5	Protein Arginin Methyltransferase 6 (PRMT6)	9
1.2	Der Histoncode	11
1.2.1	Die Struktur des Chromatins.....	11
1.2.2	Posttranslationale Modifikationen an Histon N-Termini	12
1.2.3	Erkennung von Histonmodifikationen	14
1.2.4	Lysin 4 Methylierung und MLL-Komplexe	16
1.2.5	Lysin 27 Methylierung und Polycomb-Komplexe.....	19
1.3	Zielsetzung.....	22
2	Material	23
2.1	Zelllinien	23
2.2	Bakterienstämme	23
2.3	Plasmide.....	24
2.4	Peptide.....	24
2.5	Antikörper	25
2.6	Oligonukleotide	26
2.6.1	qPCR-Primer	26
2.6.2	Chromatin-IP Primer	27
2.6.3	siRNA	27
2.7	Radioaktive Substanzen	27
2.8	Substrate für Methyltransferase-Reaktionen	28
2.9	Standards.....	28
3	Methoden.....	29
3.1	Zellkultur Methoden.....	29
3.1.1	Kultivierung von eukaryotischen Zellen.....	29
3.1.2	Transfektion von Plasmid-DNA mit Calciumphosphat	29
3.1.3	Transfektion von Plasmid-DNA mit Polyethylenimin.....	30
3.1.4	Transfektion von siRNA mit Dharmafect.....	31

Inhaltsverzeichnis

3.1.5	Induktion von HT29-Zellen mit Zinkchlorid	32
3.1.6	Differenzierung von NT2/D1 Zellen.....	32
3.2	Molekularbiologische Methoden.....	33
3.2.1	Herstellung kompetenter Bakterien.....	33
3.2.2	Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration	33
3.2.3	Transformation kompetenter Bakterien	34
3.2.4	Agarose-Gelelektrophorese.....	34
3.2.5	Präparative Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	35
3.2.6	Präparation von Gesamt-RNA aus eukaryotischen Zellen.....	36
3.2.7	Reverse Transkriptase Reaktion.....	36
3.2.8	Quantitative Polymerasekettenreaktion (qPCR)	37
3.3	Biochemische Methoden	40
3.3.1	Bestimmung der Proteinkonzentration (Bradford).....	40
3.3.2	Konzentrierung von Proteinen	41
3.3.3	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (PAGE)	41
3.3.4	Färbung von Proteingelen mittels Coomassie	42
3.3.5	Färbung von Proteingelen mittels colloidalem Coomassie	42
3.3.6	Silberfärbung von Proteingelen.....	43
3.3.7	Proteintransfer / Western Blot (nass)	44
3.3.8	Proteintransfer / Western Blot (halbtrocken)	45
3.3.9	Ponceau-Färbung von Membranen	45
3.3.10	Immundetektion	46
3.3.11	Entfernen von Antikörpern von einer Blotmembran.....	47
3.3.12	Präparation von GST-Fusionsproteinen aus Bakterien	48
3.3.13	Präparation von His-Fusionsproteinen aus Bakterien	49
3.3.14	Präparation von unlöslichen His-Fusionsproteinen aus Bakterien.....	50
3.3.15	Herstellung von Gesamtzellextrakt aus eukaryotischen Zellen (IPH-Extrakt).....	51
3.3.16	Herstellung von Gesamtzellextrakt aus eukaryotischen Zellen (IPH-Extrakt)	52
	mit Benzonase-Behandlung	
3.3.17	Herstellung von cytoplasmatischem Extrakt / Kernextrakt aus eukaryotischen Zellen	53
3.3.18	Aufreinigung von Strep-Tag Fusionsproteinen aus Gesamtzellextrakt.....	54
3.3.19	Immunpräzipitation (IP).....	55
3.3.20	<i>in vitro</i> Methyltransferase-Reaktion	56
3.3.21	Fluorographie.....	57
3.3.22	Szintillationsmessung von radioaktiv markierten Peptiden	57
3.3.23	Szintillationsmessung von Edman-Sequenzanalysefraktionen	58
3.3.24	Flüssig-Methyltransferase Test.....	58
3.3.25	Kopplung von Peptiden an Sulfolink-Gel	59
3.3.26	Peptid-Pulldown.....	60
3.3.27	Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP).....	61
3.3.28	Sequenzierung von Proteinen durch Edman-Abbau	64

3.3.29	Massenspektroskopische Analyse der Methylierung von Peptiden	64
3.3.30	Massenspektroskopische Identifikation von Proteinen	65
3.4	Aufreinigung von Antikörpern.....	65
3.4.1	Generierung eines PRMT6-Antikörpers in Kaninchen	65
3.4.2	Affinitätsaufreinigung von Antikörpern mittels Membran-gebundenem Antigen.....	66
3.4.3	Herstellung einer Antigen-gekoppelten GST-Säule.....	67
3.4.4	Affinitätsaufreinigung von Antikörpern mittels Antigen-gekoppelter Säule	68
4	Ergebnisse	70
4.1	Die Histon-Methyltransferase PRMT6.....	70
4.1.1	Untersuchung der <i>in vitro</i> Histon-Methyltransferaseaktivität von PRMT6	70
4.1.1.1	Vergleich der Methyltransferaseaktivität von GST-PRMT1, GST-PRMT4	
	und GST-PRMT6	70
4.1.1.2	Identifikation der von PRMT6 methylierten Histone	73
4.1.1.3	Untersuchung der PRMT6-Methyltransferaseaktivität auf Nukleosomen	74
4.1.2	Identifikation der PRMT6 - Methylierungsstellen in Histonen	76
4.1.2.1	Eingrenzung des von PRMT6 methylierten Bereichs in Histonen	76
4.1.2.2	Identifikation der von PRMT6 methylierten Arginine in Histon N-termini	
	mittels Edman-Degradation.....	77
4.1.2.3	Nachweis der Arginin 2 Methylierung durch PRMT6 <i>in vivo</i>	82
4.1.3	Charakterisierung der Methylierungspräferenz von PRMT6.....	82
4.1.3.1	Analyse der Methylierungspräferenz von PRMT6 mittels Szintillationsmessung	82
4.1.3.2	Analyse der Methylierungspräferenz von PRMT6 durch	
	massenspektroskopische Analyse.....	84
4.1.4	Einfluss anderer Histonmodifikationen auf die PRMT6-Methylierungsaktivität	85
4.2	Die Rolle der Arginin 2 Dimethylierung im Histon-Code:	87
	Bindung von Proteinen an Histon N-Termini	87
4.2.1	Suche nach potentiellen Bindungsproteinen für dimethyliertes Arginin 2	88
4.2.1.1	Histon H3-Peptid-Pulldowns mit verschiedenen Zellextrakten.....	89
4.2.1.2	Massenspektroskopische Identifizierung der differentiell bindenden Proteine	93
4.2.1.3	Verifizierung der identifizierten Histon-Bindungsproteine durch Immundetektion	96
4.2.2	Untersuchung eines möglichen Zusammenhangs zwischen Methylierungen	
	an H3R2 und H3K27	98
4.2.2.1	Untersuchung der Histonbindungseigenschaften der	
	<i>Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2)</i> Komponenten	99
4.2.2.2	Untersuchung der Histonbindungseigenschaften der	
	Protein Arginin Methyltransferase 6	100
4.3	Die Rolle der Arginin 2 Dimethylierung im Histon-Code:	102
	Effekte auf die Trimethylierung des Lysin 4 in Histon H3	102

Inhaltsverzeichnis

4.3.1	Untersuchung der von Lysin 4 regulierten c-Myc Genexpression	103
4.3.1.1	Das Wnt-Signalweg Modellsystem der APC-induzierten c-Myc Repression	103
4.3.1.2	Einfluss der PRMT6 auf die APC-vermittelte c-Myc Repression	105
4.3.2	Einfluss der Arginin 2 Dimethylierung auf den Lysin 4 Methyltransferasekomplex	107
4.3.2.1	Untersuchung der Aktivität von Lysin 4 Methyltransferasen in Abhängigkeit von der Arginin 2 Methylierung	108
4.3.2.2	Bindung der Lysin 4 Methyltransferase Komplexkomponenten an Histon H3 N-Termini	110
4.3.2.3	Auswirkung der Arginin 2 Dimethylierung auf die Chromatinrekrutierung des Lysin 4 Methyltransferasekomplexes	112
4.3.2.4	Transkriptions- und Chromatineffekte der PRMT6 vermittelten Arginin 2 Dimethylierung während der neuronalen Differenzierung	117
4.4	Herstellung eines polyklonalen PRMT6 Antikörpers	120
4.4.1	Generierung des polyklonalen PRMT6fl Antikörpers in Kaninchen	120
4.4.1.1	Affinitätsaufreinigung des PRMT6fl Antikörpers über Membranen	124
4.4.1.2	Affinitätsaufreinigung des PRMT6fl Antikörpers durch Antigen-gekoppelte Säulen	126
5	Diskussion	130
5.1	PRMT6 ist eine neue Histon-Methyltransferase	130
5.1.1	PRMT6 methyliert Histone	131
5.1.2	PRMT6 methyliert <i>in vitro</i> Arginin 2 in Histon H3 und Arginin 3 in Histon H4 und H2A .	132
5.1.3	Die <i>in vivo</i> Methylierung von Arginin 2 in Histon H3 durch PRMT6	133
5.1.4	PRMT6 katalysiert präferentiell die Dimethylierung von Arginin 2	134
5.2	Die Rolle von PRMT6 im Histoncode	136
5.2.1	Suche nach Interaktionspartnern der Arginin 2 Dimethylierung	137
5.2.2	Untersuchung des potentiellen Zusammenhangs zwischen Arginin 2 und Lysin 27 Methylierung an Histon H3	139
5.2.3	Die Aktivität von PRMT6 wird von anderen Histonmodifikationen beeinflusst	140
5.2.4	Regulation der Lysin 4 Trimethylierung durch die PRMT6-vermittelte Arginin 2 Dimethylierung	142
5.2.4.1	Einfluss von PRMT6 auf die c-Myc Genexpression	142
5.2.4.2	Die Aktivität bzw. Bindung des MLL-Komplexes wird durch die Arginin 2 Methylierung verringert	144
5.2.4.3	Die Funktion der Arginin 2 Methylierung bei Chromatinprozessen	147
5.2.5	Modell der Genregulation durch PRMT6	148
5.3	Offene Fragen und Ausblick	150
6	Zusammenfassung	153
7	Summary	155

8	Abkürzungen	157
9	Literaturverzeichnis.....	161
10	Anhang	172
10.1	Lebenslauf.....	172
10.2	Danksagung	173
10.3	Ehrenwörtliche Erklärung.....	174
10.4	Publikation	174

1 Einleitung

1.1 Protein Arginin Methyltransferasen (PRMT)

Protein N-Arginin Methyltransferasen (PRMT) gehören wie beispielweise Kinasen oder Acetyltransferasen zu einer Gruppe von Enzymen, welche die Struktur anderer Proteine durch die kovalente Kopplung mit einer chemischen Gruppe verändern, und somit posttranslational modifizieren. Die von PRMTs katalysierte posttranslationale Modifikation der Argininmethylierung hat sich erst im letzten Jahrzehnt zu einem Gebiet ausgiebiger Forschung entwickelt. Dabei wurden PRMTs als essentielle Bestandteile in diversen zellulären Prozessen und Regulationsmechanismen identifiziert.

1.1.1 Posttranslationale Modifikation von Proteinen

Der Aufbau eines Proteins wird maßgeblich durch die Sequenz seiner Aminosäuren festgelegt (Primärstruktur). Aus der spezifischen Faltung der Polypeptidkette resultiert dann die räumliche Struktur, also die Sekundär- und Tertiärstruktur. Durch mögliche Bindung mehrerer Polypeptidketten untereinander (Quartärstruktur) wird dann letztendlich die Struktur eines Proteins und damit seine biochemische Funktion definiert. Eine Möglichkeit, diese Funktion nachträglich zu modulieren bzw. regulieren, besteht durch posttranslationale Modifikation (PTM) des Proteins an bestimmten Aminosäureseitenketten. Dabei werden chemische Gruppen kovalent an diese Seitenketten gekoppelt, wodurch Eigenschaften des Proteins, wie beispielsweise Hydrophilität oder Ladungsverteilung verändert werden können.

Am besten untersucht ist die Phosphorylierung von Serin, Threonin und Tyrosin, bei der eine Phosphatgruppe von ATP auf die Hydroxylgruppe der jeweiligen Aminosäure übertragen wird (Pawson 2004). Zwei Modifikationen, bei der relativ große Moleküle an das Protein angehängt werden, sind zum einen die Ubiquitinierung (Hershko 2005) und die Sumoylierung (Hay 2005). Dabei werden zum einen das Ubiquitin (8,5 kDa) bzw. das *Small Ubiquitin-like Modifier* (SUMO 1-3; 12 kDa) an Lysine gekoppelt. Neben weiteren Modifikationen wie Glykosylierung, ADP-Ribosylierung oder Biotinylierung etc. sind zwei posttranslationale Modifikationen von besonderer Bedeutung für die vorliegende Arbeit: die Methylierung von Lysin- und

Einleitung

Argininseitenketten. Der Transfer von Methylgruppen auf die Seitenkette des Arginins wird von der Enzymfamilie der PRMTs katalysiert.

Arginin gehört zur Gruppe der basischen Aminosäuren und trägt unter physiologischen Bedingungen in seiner Seitenkette eine positive Ladung an der Guanidinogruppe (s. **Abbildung 1.1**). Dadurch ist es im Zusammenhang von Protein-Protein-Interaktionen befähigt Wasserstoffbrückenbindungen bzw. Kation- π -Wechselwirkungen einzugehen (Hughes and Waters 2006). Die posttranslationale Modifikation dieser Seitenkette durch Methylierung an der Guanidinogruppe führt damit zu veränderten Bindungseigenschaften dieser Aminosäure in Bezug auf H-Brücken, sterische und hydrophobe Eigenschaften.

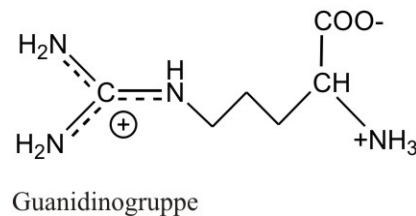


Abbildung 1.1: Lewisformel der Aminosäure Arginin

Die Existenz einer Methylgruppe am terminalen Stickstoff des Arginins wurde im Jahr 1967 das erste Mal nachgewiesen (Paik and Kim 1967). Die biochemische Aufreinigung einer Arginin Methyltransferase sowie die grundlegende Untersuchung des Reaktionsmechanismus erfolgte 1977 (Lee et al. 1977). Die Klonierung der ersten PRMT gelang 1997 (Abramovich et al. 1997). Seit dem wurde das Wissen über Argininmethylierung und PRMTs stetig erweitert und lieferte neue Erkenntnisse über die Funktion und Bedeutung dieser Enzyme.

1.1.2 Struktur der Protein Arginin Methyltransferasen

PRMTs werden in evolutionär konservierter Form in verschiedenen Organismen von Hefepilzen (*Saccharomyces cerevisiae*; (Gary et al. 1996)) über Insekten (*Drosophila melanogaster*; (Boulanger et al. 2004)) und Pflanzen (*Brassica oleracea*; (Pei et al. 2007)) bis hin zu Menschen gefunden. In Säugerzellen sind momentan 11 PRMTs bekannt (Pal and Sif 2007). Eine schematische Darstellung dieser 11 PRMTs ist in **Abbildung 1.2** wiedergegeben.

Die Sequenz der PRMTs lässt sich in charakteristische Bereiche aufteilen (Zhang et al. 2000): die hochkonservierte S-Adenosyl-L-methionin (SAM) Bindungsdomäne und die weniger konservierte Substratbindungsdomäne, sowie die für jede PRMT spezifischen N- und C-terminalen Abschnitte der Proteinsequenz. Die SAM- und die Substratbindungsdomäne bilden zusammen die katalytische Domäne der PRMTs. Die SAM-Bindungsdomäne enthält den Teil, welcher für die Bindung des Methylgruppendonors SAM zuständig ist. Diese N-terminale Domäne ist typisch für alle SAM-abhängigen Methyltransferasen und besteht aus der sogenannten Rossmann-Falte. Typische Struktur motive, die in dieser Domäne vorkommen sind die Motive I, II, III und das post I Motiv sowie der „Double E loop“. Der C-terminale Abschnitt, welcher für die Bindung des Substratproteins verantwortlich ist, liegt in Form einer „Barrel-like“ Struktur vor. In ihm ist der für PRMTs charakteristische „THW-loop“ lokalisiert.

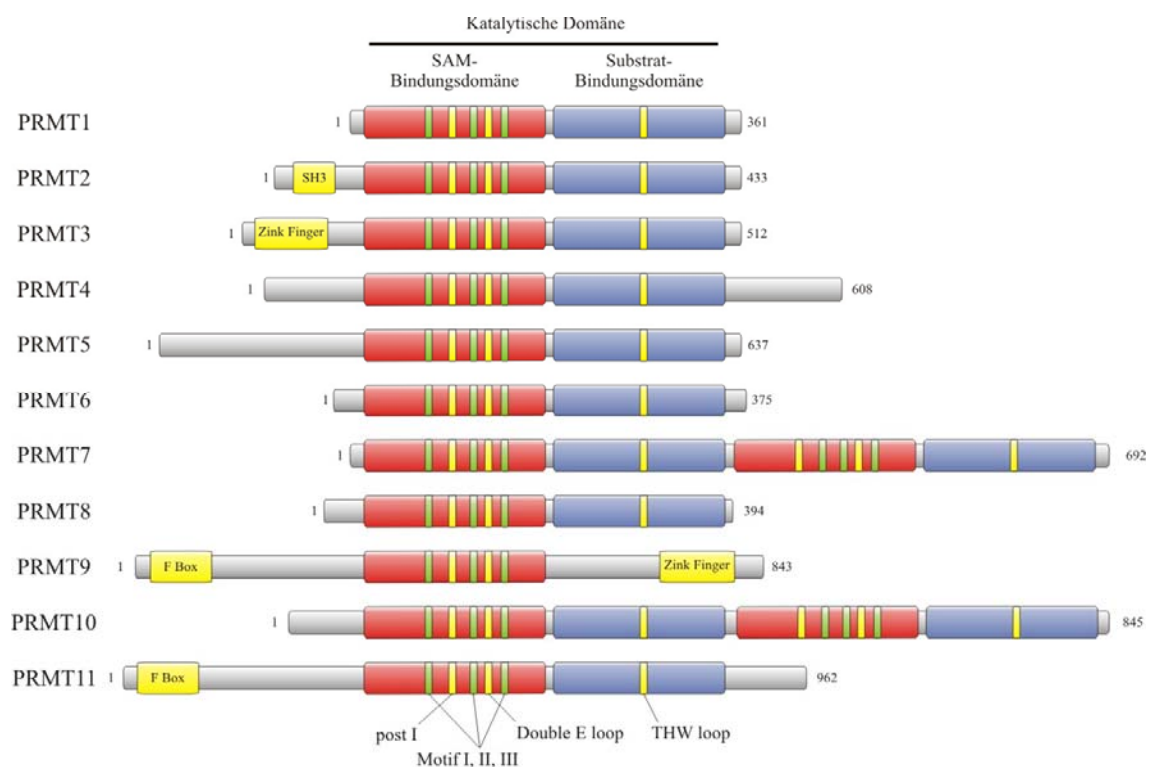


Abbildung 1.2: Sequenzdarstellung der humanen Protein Arginin Methyltransferasen modifiziert nach (Pal and Sif 2007). Die Zahlen geben die Größe der PRMTs in Aminosäuren an.

PRMT2 besitzt zusätzlich zu den konservierten Strukturen aller PRMTs noch eine SH3-Domäne, die für die Bindung des hnRNP-Proteins E1B-AP5 benötigt wird (Kzhyshkowska et al. 2001). Der Zink-Finger von PRMT3 ist essentiell für die Methylierung von RNA-assoziierten Substratproteinen (Frankel and Clarke 2000). PRMT7 und PRMT10 bestehen jeweils aus einem Duplikat der katalytischen Domänen. PRMT9 und PRMT11 enthalten ein F Box Motiv, welches dafür bekannt ist an den Ubiquitin Ligase Komplex zu binden (Cardozo and Pagano 2004). Aufgrund der fehlenden Substrat-Bindungsdomäne unterscheidet sich PRMT9 am stärksten von den anderen PRMTs und wurde nur aufgrund der konservierten SAM-Bindungsdomäne also solche identifiziert (Cook et al. 2006).

Die erste Röntgenstrukturanalyse einer Protein Arginin Methyltransferase wurde im Jahr 2000 anhand von PRMT3 durchgeführt (Zhang et al. 2000). Die Struktur der konservierten Region von PRMT1 (AS 41 – 353) wurde dann 2003 aufgelöst (Zhang and Cheng 2003). Die Kristallstruktur von PRMT1 ist in **Abbildung 1.3** gezeigt. Man erkennt die beiden konservierten Bereiche: die SAM-Bindungsdomäne (rot) sowie die Substratbindungsregion oder „Barrel-like“ Struktur (blau). Der N-Terminus von PRMT1 ist in grau dargestellt. Desweiteren sind das Substrat Arginin und das Cofaktorprodukt S-Adenosyl-homocystein (SAH) zu sehen, welche während der Kristallisation anwesend waren.

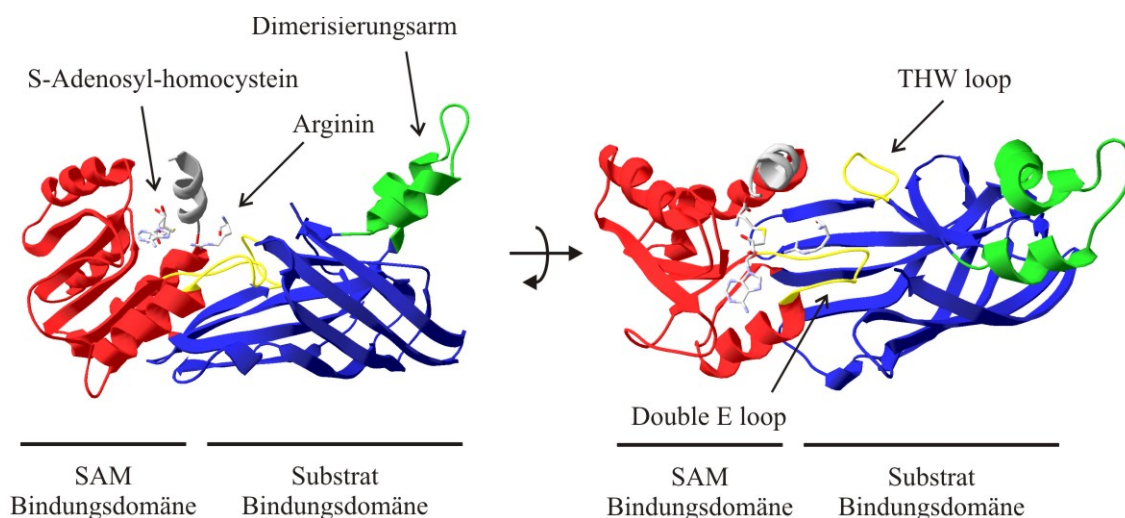


Abbildung 1.3: Röntgenkristallstruktur von PRMT1

Zwei Ansichten der monomeren Kristallstruktur von PRMT1. Die SAM-Bindungsdomäne ist in rot dargestellt, die Substrat Bindungsdomäne („Barrel-like“ Struktur) in blau und der Dimerisierungsarm in grün. Das S-Adenosyl-homocystein sowie das Substrat Arginin sind im aktiven Zentrum gebunden. Der Double E bzw. THW Loop sind gelb markiert. (gezeichnet nach 1OR8.pdb aus (Zhang and Cheng 2003))

Die Bindung des Cofaktorprodukts SAH wird hauptsächlich durch drei Interaktionen erreicht: einer Glycin-reichen Schlaufe (G78, G80), der aziden Seitenkette von E100 und der Carboxylgruppe von E 129. Diese drei Interaktionen sind typisch für SAM-abhängige Methyltransferasen (Cheng and Roberts 2001). Desweiteren verstärkt die N-terminale Helix (grau) diese Bindung, indem sie „herunterklappt“ und dadurch das SAM in der Bindungsstelle hält (Yue et al. 2007).

Die Bindung des Substratpeptids durch die Substratbindungsdomäne dagegen konnte in der zugrundeliegenden Kristallstruktur nicht eindeutig geklärt werden. Die Elektronendichten deuten aber auf drei verschiedene azide Taschen in der „Barrel-like“ Struktur hin, welche zusammen wirken, um das Substrat binden können. Zwei dieser Taschen liegen in der Falte zwischen SAM- und Substratbindungsdomäne, eine davon nahe am „THW-loop“ (gelb). Die dritte Bindungsstelle ist dagegen etwas außerhalb in der „Barrel-like“ Struktur lokalisiert.

Das katalytische Zentrum von PRMT1 ist wie in allen Arginin Methyltransferasen konserviert und wird durch Seitenketten von Aminosäuren geformt, die eine Schlaufenstruktur bilden. Diese wird aufgrund zweier charakteristischer Glutamatreste als „Double E loop“ bezeichnet. In PRMT1 sind es E144 und E153, die durch Wasserstoffbrückenbindungen die Guanidinogruppe des Substrat Arginins binden.

Ein weiteres Charakteristikum der PRMT Struktur ist der Dimerisierungsarm. Durch hydrophobe Interaktion dieses Arms mit der Außenseite der SAM-Bindungsregion wird es den PRMTs ermöglicht, Dimere zu bilden. Deletionsmutanten dieses Dimerisierungsarms, welche enzymatisch inaktiv sind, haben gezeigt, dass die Dimerisierung für die Bindung des S-Adenosyl-methionins essentiell ist.

1.1.3 Mechanismus der Arginin Methylierung

Frühe Untersuchungen des Mechanismus der Argininmethylierung wurden bereits 1977 (Lee et al. 1977) durchgeführt, wobei der genaue molekulare Ablauf allerdings noch nicht bis ins letzte Detail geklärt ist. Ein vereinfachtes Schaubild der Argininmethylierung zeigt **Abbildung 1.4**.

Einleitung

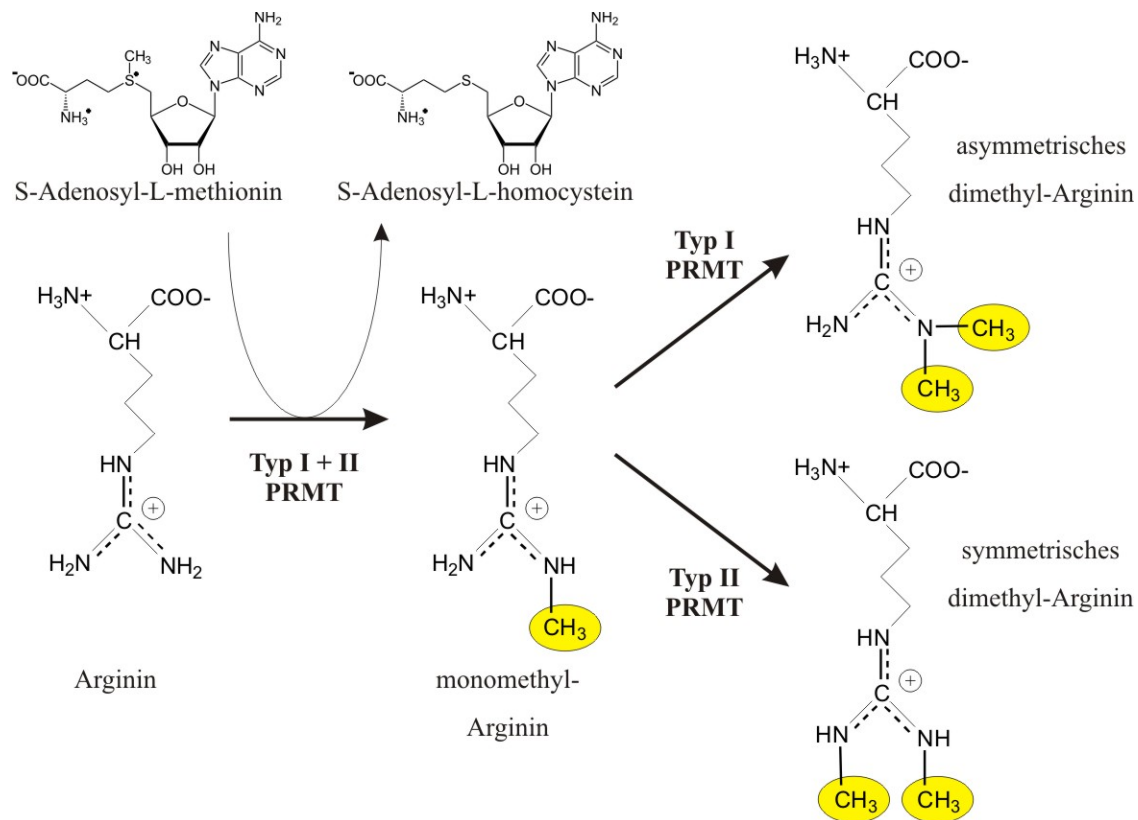


Abbildung 1.4: Schematische Darstellung des Mechanismus der Mono- bzw. asymmetrischen und symmetrischen Dimethylierung von Arginin durch PRMTs

modifiziert nach (Bedford and Richard 2005)

Protein Arginin N-Methyltransferasen transferieren Methylgruppen vom Cofaktor S-Adenosyl-L-methionin auf das terminale ω -Stickstoffatom der Guanidinogruppe der Argininseitenkette. Dies führt zur Bildung von S-Adenosyl-L-homocystein, dem Produkt des Cofaktors, sowie zum methylierten Arginin (Gary and Clarke 1998). Dabei kann es zu drei Reaktionsprodukten kommen: dem monomethylierten ω -N^G-Arginin (MMA), dem asymmetrisch ω -N^G,N^G – dimethylierten Arginin (aDMA) und dem symmetrisch ω -N^G,N^G–dimethylierten Arginin (sDMA). Die Methylierung der Argininseitenkette setzt sich aus zwei Teilreaktionen zusammen. Zuerst die Übertragung einer Methylgruppe auf das Stickstoffatom, also der Monomethylierung. Bisher ging man davon aus, dass dieser Reaktionsschritt von allen PRMTs katalysiert werden kann. Im zweiten Schritt muss unterschieden werden, an welches Stickstoffatom die zweite Methylgruppe gekoppelt wird. **Typ I** PRMTs katalysieren die Methylierung des bereits methylierten Stickstoffs, was zur asymmetrischen Dimethylierung führt. **Typ**

II PRMTs koppeln die zweite Methylgruppe an das noch freie Stickstoffatom, woraus eine symmetrische Dimethylierung resultiert.

Bisher konnte für folgende Arginin Methyltransferasen **Typ I** Aktivität gezeigt werden: PRMT1(Lin et al. 1996), PRMT3 (Tang et al. 1998), PRMT4 (Chen et al. 1999), PRMT6 (Frankel et al. 2002) sowie für PRMT8 (Lee and Skalnik 2005). Zu den reinen **Typ II** PRMTs gehört momentan lediglich PRMT5 (Branscombe et al. 2001). Für PRMT7 (Lee et al. 2005b) und PRMT9 (Cook et al. 2006) wurde beobachtet, dass diese sowohl die symmetrische wie auch die asymmetrische Methylierung katalysieren können. Einzig für PRMT2, PRMT10 und PRMT11 konnte noch keine enzymatische Aktivität nachgewiesen werden.

Der exakte Ablauf der Methylierungsreaktion bedarf allerdings noch weiterer Aufklärung. Beispielsweise ist nicht eindeutig geklärt, ob PRMTs ihre Substrate in prozessiver oder distributiver Weise methylieren. Es konnte für PRMT4 gezeigt werden, dass die Bindung des SAM der Bindung des Substrat Arginins vorangeht (Yue et al. 2007). Zusammen mit den Kristallstrukturdaten (Zhang and Cheng 2003) und der Beobachtung der Dimerisierung von PRMT1 ergibt sich daraus das Modell eines prozessiven Mechanismus, in dem zwei dimerisierte, mit SAM beladene PRMTs das Substrat nacheinander methylieren und das dimethylierte Produkt die Enzyme danach verlässt. Neuere enzymatische Studien an PRMT1 (Wooderchak et al. 2008) und PRMT6 (Lakowski and Frankel 2008) dagegen favorisieren wiederum das dissoziative bzw. distributive Modell der Argininmethylierung, da dort ausgehend von unmethyliertem Arginin vermehrt die Bildung des monomethylierten Produktes beobachtet wurde und kaum dimethyliertes Arginin. Bei diesem Modell verlässt das methylierte Produkt das katalytische Zentrum sofort nach der Reaktion, daher die erhöhten Mengen an monomethyliertem Arginin.

1.1.4 Substrate und Funktionen der Protein Arginin Methyltransferasen

Die Substratspezifität der Protein Arginin Methyltransferasen ist ein weiteres Gebiet auf dem noch Unklarheit herrscht. Es ist bekannt, dass Proteine die Glycin-Argininreiche (GAR) Motive tragen, bevorzugte Substrate von einigen PRMTs sind (Najbauer et al. 1993). So sind die Arginine in den Sequenzen GGRGRGG aus Fibrillarin (Gary and Clarke 1998) bzw. GGRGGS aus den *heterogeneous nuclear ribonuclear proteins*

(hnRNP) (Kim et al. 1997) Methylierungsstellen von PRMT1. Die N-Termini von Histonen sind ein anderes bevorzugtes Substrat von PRMTs (Paik and Kim 1967), gehören aber nicht zwingend zur Kategorie der GAR-Motive. Eine eindeutige Systematik in der Substraterkennung ist bisher noch nicht gefunden worden. So methyliert beispielsweise PRMT1 die GAR-Region in Fibrillarin und die N-Termini von Histonen, während PRMT4 Histone, aber nicht GAR methylieren kann. Die Spezifität der PRMTs geht also weit über ein RGG-Motiv hinaus.

Zur Identifizierung neuer Proteine, welche Substrate von PRMTs sind, werden daher unterschiedliche Methoden eingesetzt. Der Einsatz eines *in vitro* Substrat-Screens beispielsweise führte zur Entdeckung des *thymocyte cyclic AMP-regulated phosphoprotein* (TARPP) als neues PRMT4-Substrat. Dabei wurde eine Protein Library mit 37200 His-Fusionsproteinklonen auf PVDF-Filtermembranen gebracht und auf *in vitro* Methylierung durch PRMT4 getestet (Kim et al. 2004). Eine weitere Methode ist die Verwendung der Proteomic-basierten SILAC-Technik (*stable isotope labeling by amino acids in cell culture*). Hierbei wird ausgenutzt, dass Zellen nicht-radioaktives, Isotopen-markiertes $^{13}\text{CD}_3$ -Methionin *in vivo* zum Methylgruppendonor S-Adenosyl- $^{13}\text{CD}_3$ -Methionin metabolisieren und die $^{13}\text{CD}_3$ -Gruppe bei Methyltransferasereaktionen auf die methylierten Proteine übertragen. Diese können dann in massenspektroskopischen Analyseverfahren als Methylierungssubstrate identifiziert werden (Ong et al. 2004).

PRMTs sind ubiquitär exprimierte Enzyme. Ihre Bedeutung für die Funktion des lebenden Organismus konnte durch Knock-out Mausexperimente verdeutlicht werden. So entwickeln sich PRMT1^{-/-} Embryonen nicht weiter als Tag E6.5 (Pawlak et al. 2000), während PRMT4^{-/-} Mäuse bei Geburt letal sind (Yadav et al. 2003). Dies verdeutlicht die essentielle Bedeutung von PRMTs für die Entwicklung sowie ihre nicht redundante Funktion. Die zellulären Aufgaben der PRMTs erstrecken sich dabei über Bereiche wie Transkriptionskontrolle, DNA Reparatur, Signaltransduktion, RNA-Prozessierung oder Proteinlokalisierung.

PRMT1 beispielsweise ist für den Großteil der methylierten Arginine in Säugerzellen verantwortlich (Tang et al. 2000) und spielt bei essentiellen Prozessen wie Transkription, DNA Reparatur, Signaltransduktion wichtige Rollen. So methyliert PRMT1 R3 in Histon H4 während der Östrogen-induzierten Nukleären Rezeptor-vermittelten Genexpression, was zu einer Coaktivierung der Transkription führt (Strahl et al. 2001). Außerdem interagiert PRMT1 mit weiteren Transkriptionsfaktoren wie p53

(An et al. 2004) oder YY1 (Rezai-Zadeh et al. 2003), und wirkt dort ebenfalls als Coaktivator. MRE11, eine Komponente des DNA Doppelstrangbruch-Reparaturkomplexes ist ein weiteres Substrat der PRMT1. Dabei wird ein GAR-Motiv methyliert, welches für die Exonukleaseaktivität von MRE11 entscheidend ist (Boisvert et al. 2005). Im Interferon-Signalweg reguliert PRMT1 die PIAS1-vermittelte Repression des STAT1 Transkriptionsfaktor durch Methylierung des PIAS1 Proteins (Weber et al. 2009).

PRMT4 oder auch *Coactivator Associated Methyltransferase 1* (CARM1) genannt, ist ebenfalls in die Nukleäre Rezeptor-vermittelte Genexpression involviert und interagiert dort mit Coaktivatoren der p160 Familie, wodurch die Transkriptionsaktivierung durch den Rezeptor verstärkt wird (Chen et al. 1999). Dabei wirkt PRMT4, ähnlich wie PRMT1, durch seine Histonmethylierung, als Coaktivator, indem es R17 in Histon H3 methyliert (Bauer et al. 2002). Für die Kooperation von PRMT4 und PRMT1 als Coaktivatoren von Transkriptionsfaktoren wurden weitere Beispiele gefunden: bei der Genaktivierung durch p53, NF- κ B oder STAT5 (An et al. 2004; Hassa et al. 2008; Kleinschmidt et al. 2008).

PRMT5 zeigt ebenfalls Histonmethylierungsaktivität auf R3 in Histon H4 sowie R8 in Histon H3 (Pal et al. 2004). Für PRMT5 wurde im Gegensatz zu anderen PRMTs gefunden, dass dieses eine repressive Funktion besitzt. So konnte gezeigt werden, dass es mit hSwi/Snf Chromatin Remodeller Komplexen interagiert und repressiv auf die Expression von c-Myc Zielgenen wirkt (Pal et al. 2003). Eine andere Interaktion geht PRMT5 mit dem *nucleosome remodeling and deacetylase* (NuRD) Komplex ein (Le Guezennec et al. 2006) und wirkt auch hier repressiv auf die Genregulation.

1.1.5 Protein Arginin Methyltransferase 6 (PRMT6)

Protein Arginin Methyltransferase 6 ist ein neues Mitglied der PRMT Familie, über das im Vergleich zu PRMT1 und PRMT4 noch wenig bekannt ist. PRMT6 wurde durch Suche nach PRMT-Sequenzhomologien mittels der BLAST Methode (Altschul et al. 1997) als Mitglied dieser Enzymfamilie identifiziert (Frankel et al. 2002). Die Sequenzanalyse zeigte, dass PRMT6 sämtliche konservierten Struktur motive der PRMT-Familie besitzt (s. **Abbildung 1.2**), aber außerhalb der katalytischen Domäne keine weiteren besonderen Strukturmerkmale aufweist. Bei *in vitro* Methylierungen mit PRMT6 als GST-Fusionsprotein konnte **Typ I** Methyltransferaseaktivität nachgewiesen

Einleitung

werden. PRMT6 ist also in der Lage die Produktion von sowohl monomethyliertem wie auch asymmetrisch dimethyliertem Arginin zu katalysieren (Frankel et al. 2002). Als Substrate wurden GAR-Motiv enthaltende Proteine verwendet. Als erste Arginin Methyltransferase wurde für PRMT6 die Automethylierung beobachtet, die Fähigkeit also Arginine seiner eigenen Sequenz zu methylieren. Intrazelluläre Lokalisationsstudien mit GFP-markierten Fusionsproteinen in HeLa Zellen identifizierten PRMT6 als hauptsächlich kernlokalisiert.

In den darauffolgenden Jahren wurden wichtige zelluläre Funktionen von PRMT6 entdeckt. So konnten (Boulanger et al. 2005) zeigen, dass PRMT6 die Aktivität des HIV Transaktivator Proteins (HIV-1 Tat) und somit auch die virale Replikation negativ beeinflusst. Dies wird durch Methylierung von R52 und R53 in der Transaktivierungsdomäne von Tat erreicht (Xie et al. 2007). Im Zusammenhang viraler Transkription bzw. Export wurde für die Proteine HIV-1 Rev und HIV-1 Nucleocapsid (NC) ebenfalls eine Regulation durch PRMT6 katalysierte Argininmethylierung aufgezeigt. Der von HIV-1 Rev-vermittelte Export viraler RNA aus dem Nukleus (Invernizzi et al. 2006), wie auch die Initiierung Reverser Transkription durch HIV-1 Nucleocapsid (NC) (Invernizzi et al. 2007) wird durch Argininmethylierung dieser Proteine beeinträchtigt.

Eine weitere Funktion der PRMT6 konnte im Bereich der DNA-Reparatur gefunden werden. Dort wird die Bindungs- und Prozessierfähigkeit der DNA Polymerase β durch eine Argininmethylierung von R83 und R152 verstärkt. In den Arbeiten von (El-Andaloussi et al. 2006) konnte PRMT6 als die dafür verantwortliche Methyltransferase identifiziert werden.

Ebenfalls als PRMT6 Substrat identifiziert wurde das HMGA1a Protein der *high mobility group A* Proteinfamilie (Miranda et al. 2005). Diese Proteine binden die kleine Furche AT-reicher DNA-Sequenzen und regulieren die Assemblierung von Nukleoprotein-DNA Komplexen (Reeves and Beckerbauer 2001). Sie sind außerdem dafür bekannt durch eine Vielzahl von posttranslationalen Modifikationen reguliert zu werden. Die von PRMT6 methylierten Stellen konnten durch Massenspektrometrie an R57 und R59 im zweiten „AT-hook“ des HMGA1a Proteins lokalisiert werden (Sgarra et al. 2006).

Die hier erwähnten Substrate von PRMT6 sind wie diese selbst auch im Zellkern lokalisiert und Chromatin-assoziiert. Obwohl die PRMT6 also in unmittelbarer Nähe zu Histonen zu finden ist und einige PRMTs Histone als Substrate erkennen, wurde eine

mögliche Histonmethylierung durch PRMT6 bisher noch nicht untersucht. Diese potentielle Funktion der PRMT6 zu charakterisieren, war eines der Ziele der vorliegenden Arbeit.

1.2 Der Histoncode

Obwohl die Tatsache, dass Histone wie andere Proteine posttranslationalen Modifikationen (s. 1.1.1) ausgesetzt sind, lange bekannt war, kam die Idee des Histoncodes das erste Mal im Jahr 2000 auf (Strahl and Allis 2000). Sie besagt, dass die einzelnen Modifikationen an den N-Termini der Histone oder Kombinationen derselben Auswirkungen auf die Prozesse an diesem Chromatinabschnitt haben. Genauer gesagt diese Modifikationen legen fest, in welcher Struktur das Chromatin vorliegt, also ob es frei zugänglich ist oder welche DNA- bzw. Chromatinbindenden Proteine rekrutiert werden. Dadurch werden Prozesse am zugehörigen Chromatinabschnitts wie Genexpression, DNA-Reparatur oder DNA-Replikation reguliert.

Insbesondere für die Regulation der Genexpression ergibt sich durch den Histoncode eine neue Möglichkeit diese zu steuern. Dabei üben einige posttranslationale Modifikationen Effekte aus, welche die Expression begünstigen und stellen somit **aktivierende** Markierungen dar. Andere Modifikationen der Histon N-Termini beeinflussen die Genexpression in negativer Weise und sind daher **repressive** Markierungen.

1.2.1 Die Struktur des Chromatins

Die DNA, der Träger der genetischen Information liegt in eukaryotischen Zellen nicht isoliert vor, sondern ist zusammen mit Proteinen als Chromatin organisiert (s. **Abbildung 1.5 A**). Der DNA-Doppelstrang ist um ein Oktamer aus den Kernhistonen H3, H4, H2A und H2B gewickelt und bildet ein Nukleosom (s. **Abbildung 1.5 B**). Mehrere Nukleosomen formen zusammen mit dem Brückenhiston H1 die Solenoidstruktur der Chromatinfilamente, welche dann durch weitere Faltung und Schlaufenbildung zum Chromosom führt (Kornberg and Lorch 1999).

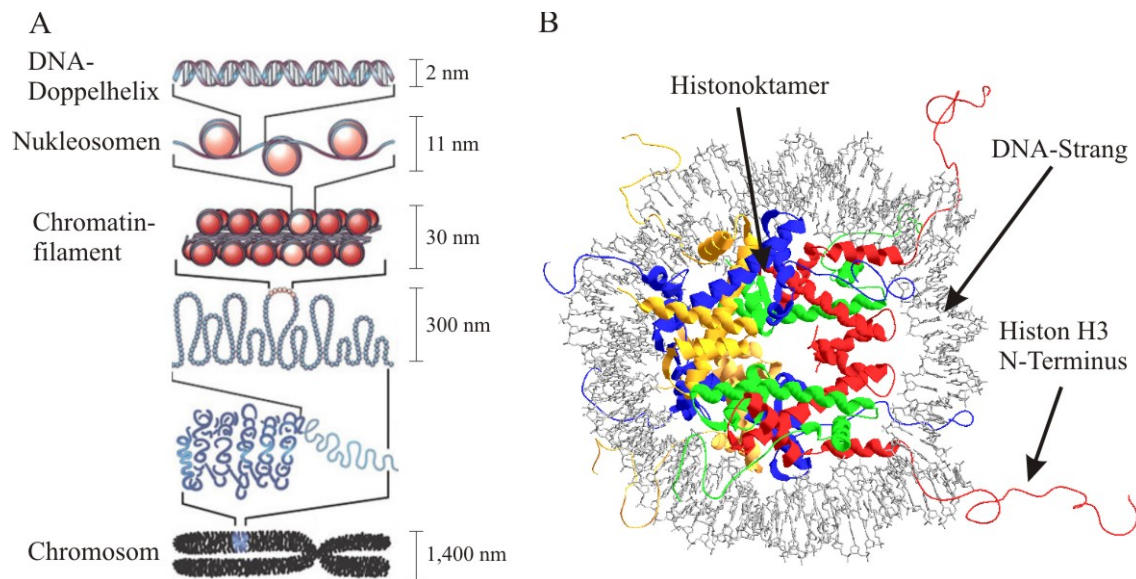


Abbildung 1.5: Schema der Chromatin- (A) und Nukleosomenstruktur (B)

(A) Schematische Darstellung des Aufbaus von Chromatin in eukaryotischen Zellen. (B) Röntgenkristallstruktur eines Nukleosoms. Die DNA-Doppelhelix ist in grau dargestellt, das Histonoktamer besteht aus den Histonen H3 (rot), H4 (grün), H2A (blau) und H2B (gelb). Der N-Terminus eines Histon H3 ist exemplarisch hervorgehoben. (gezeichnet nach 1KX5.pdb aus (Davey et al. 2002))

Histone sind Proteine mit einem hohen Anteil an basischen Aminosäuren und bestehen aus einer globulären Domäne, die für die Bindung an die DNA zuständig ist und aus frei beweglichen N- bzw. C-terminalen Enden. Die Enden ragen aus der Nukleosomstruktur heraus, und nehmen keine feste Struktur ein (Luger and Richmond 1998).

1.2.2 Posttranslationale Modifikationen an Histon N-Termini

Die frei zugänglichen N-Termini der Histone können kovalent posttranslational modifiziert werden (Turner 2002). Serine und Threonine werden von verschiedenen Kinasen phosphoryliert, Lysinreste können von Histon Acetyltransferasen mit Acetylgruppen versehen werden oder von Lysin Methyltransferasen methyliert werden. Dabei muss unterschieden werden, ob das Lysin mono-, di- oder trimethyliert wird. Die Seitenketten von Argininen können durch PRMTs auch in Histonen symmetrisch oder asymmetrisch methyliert werden. Dabei weisen die histonmodifizierenden Enzyme in Bezug auf das jeweilige Zielarginin ein extrem hohes Maß an Spezifität auf. Der N-Terminus von Histon H4 aber vor allem der von Histon H3 spielt in der vorliegenden Arbeit eine besondere Rolle. **Abbildung 1.6** zeigt einen Überblick über die wichtigsten

Modifikationen bzw. Histonmarkierungen, welche an den Enden dieser beiden Histone identifiziert werden konnten. Außerdem sind im Falle der Argininmethylierung die dafür verantwortlichen Enzyme aufgeführt (Pal and Sif 2007).

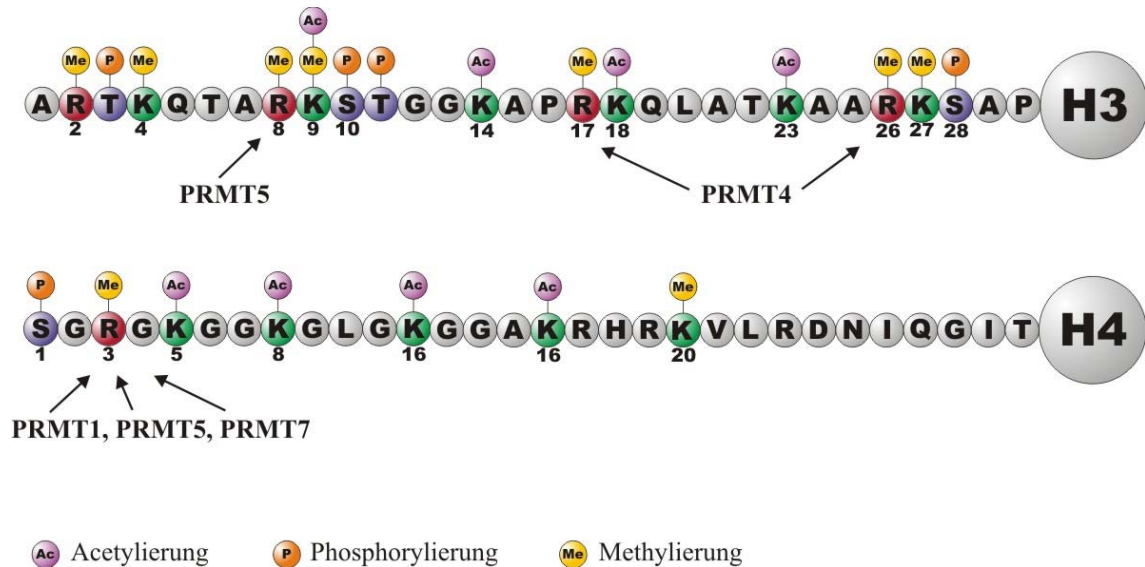


Abbildung 1.6: Histonmodifikationen an den N-Termini der Histone H3 und H4

modifiziert nach (Pal and Sif 2007). Für die methylierten Arginine sind die dafür zuständigen Protein Arginin Methyltransferasen mit bekannter Histonmethyltransferaseaktivität angegeben.

Die Existenz bestimmter dieser Modifikationen an den Histon N-Termini hat Auswirkungen auf Chromatinprozesse wie beispielsweise die Transkription von Genen. Die Acetylierung von Lysinen wie beispielsweise H3K14, H4K8 und H4K16 durch Histon Acetyltransferasen (HAT) führt generell zu einer Öffnung der Chromatinstruktur und damit zu einer besseren Zugänglichkeit für Transkriptionsfaktoren, was wiederum in eine aktive Transkription resultiert (Zhang et al. 1998a). Sie sind also aktivierende Histon Markierungen. Das Entfernen dieser Acetylgruppen durch Histon Deacetylasen (HDAC) dagegen hat die Repression der Genexpression zur Folge (Pazin and Kadonaga 1997).

Eine andere Modifikation ist die Methylierung von K9 in Histon H3, welche durch die Lysin Methyltransferase SUV39H1 katalysiert wird (Rea et al. 2000). Diese Modifikation wie auch das dafür zuständige Enzym treten vermehrt in heterochromatischen, also transkriptionell inaktiven Bereichen des Chromatins auf (Aagaard et al. 1999). Damit ist die K9 Methylierung eine repressive Histonmarkierung.

Eine andere Eigenschaft des Histoncodes ist die gegenseitige Beeinflussung von Histonmarkierungen. Beispielsweise werden Histon H3 N-Termini, welche an S10 phosphoryliert sind (Hsu et al. 2000) von den HATs, die K14 am selben Histon acetylieren, als Substrate bevorzugt (Lo et al. 2000). Dies repräsentiert eine gegenseitige positive Beeinflussung. Umgekehrt verhindert die Phosphorylierung des S10 die Methylierung des K9 durch SUV39H1 (Rea et al. 2000). Auf die K9 Methylierung hat die S10 Phosphorylierung also einen negativen Effekt. Insgesamt schließen sich die Acetylierung von K14 und die Methylierung von K9, welche gegensätzliche Effekte auf das Chromatin haben, über die S10 Phosphorylierung gegenseitig aus.

Eine sequentielle Funktion von Histonmodifikationen bei der auch PRMTs eine Rolle spielen, findet während der Östrogen-Rezeptor-vermittelten Genaktivierung statt. Nach Östrogen Stimulation wurde gefunden, dass PRMT1 R3 in Histon H4 methyliert (Wang et al. 2001). Anschließend werden HATs an den Genpromotor rekrutiert, welche K18 und K23 in Histon H3 acetylieren. Dies wiederum führt zur Methylierung von R17 in Histon H3 durch PRMT4 (Bauer et al. 2002; Daujat et al. 2002). Diese Chromatinereignisse führen letztendlich zur Expression des Gens.

Durch die Beeinflussung der posttranslationalen Modifikationen untereinander ergeben sich viele Möglichkeiten wie diese aufeinander wirken: sie können sich gegenseitig ausschließen, kooperativ wirken oder unabhängig voneinander fungieren.

1.2.3 Erkennung von Histonmodifikationen

Die Histoncode Theorie besagt, dass die Existenz oder das Fehlen einer bestimmten Modifikation am Histon N-Termini durch Effektorproteine erkannt werden kann, und daraus spezifische Konsequenzen für den Chromatinbereich folgen (Strahl and Allis 2000).

Die spezifische Bindung dieser Proteine an bestimmte Histonmodifikationen wird durch spezielle Erkennungsdomänen erreicht, die aufgrund der Modifikation eine veränderte Affinität zum Histon N-Terminus aufweisen. Bindungen können dabei also verstärkt oder aber auch verhindert werden. Damit kann die Assoziation von Proteinen beispielsweise zur Rekrutierung von Chromatin Remodelling Komplexen führen, was die Änderung der Chromatinstruktur zur Folge hat.

Solche Interaktionen lassen sich am Beispiel des Heterochromatin Protein 1 (HP1) veranschaulichen. Das HP1 Protein wurde zusammen mit der H3K9 Trimethylierung und dem Enzym SUV39H1 an heterochromatischem Chromatin gefunden (Aagaard et al. 1999). HP1 besitzt eine Chromodomäne, die es ermöglicht mit hoher Spezifität an trimethyliertes K9 zu binden (Fischle et al. 2005). Sobald allerdings das benachbarte S10 während der Mitose phosphoryliert ist, verliert HP1 seine Bindungsfähigkeit zum H3 N-Termini und ist nicht mehr am Chromatin assoziiert, was zu einer Änderung der Chromatinstruktur führt (Hirota et al. 2005). In den letzten Jahren wurden weitere Proteine entdeckt, die besondere Struktur motive enthalten und sie dadurch befähigt werden Histonmodifikationen zu erkennen.

Der *Bromodomain PHD finger transcription factor* (BPTF), welcher Teil des NURF Remodeling Komplex ist, besitzt zwei verschiedene Erkennungsdomänen. Die Bromodomäne ermöglicht es ihm acetylierte Lysine zu binden, während der *plant homeodomain* (PHD) Finger methyliertes Lysin erkennt (Li et al. 2006). Bindungsdomänen die spezifisch an methylierte Arginine binden, wurden soweit noch nicht identifiziert. **Tabelle 1.1** gibt einen Überblick über einige der wichtigsten Bindungsdomänen im Zusammenhang des Histoncodes.

Domäne	Histonmodifikation	Protein
14-3-3	phosphorylierte Ser/Thr	Aurora-B Kinase, 14-3-3 Protein
Chromodomäne	trimethylierte Lys	Heterochromatin Protein 1 (HP1) Chromo-ATPase/helicase-DNA-binding (CHD)
Bromodomäne	acetylierte Lys	TATA-binding protein associated factor (TAF) II250 Bromodomain PHD finger transcription factor (BPTF)
WD40	dimethylierte Lys	WD repeat domain 5 (WDR5) RB-associated proteins (RbAp) 46 / 48
Tudor	trimethylierte Lys	Jumonji domain containing 2A (JMJD2A)
MBT	methylierte Lys	Lethal 3 malignant brain tumor 1 (L3MBTL1)
PHD Finger	methylierte Lys	Bromodomain PHD finger transcription factor (BPTF)

Tabelle 1.1: Überblick über einige Modifikationsbindungsdomänen

nach (Seet et al. 2006), (Ruthenburg et al. 2007)

1.2.4 Lysin 4 Methylierung und MLL-Komplexe

Eine Histonmodifikation, welche für diese Arbeit von besonderer Wichtigkeit ist, ist die Methylierung von K4 in Histon H3. Es ist bekannt, dass die Methylierung des K4 in Verbindung mit aktiver Transkription steht. So wurde die K4 Trimethylierung hauptsächlich in den Promotorbereichen (5'-Region) von nahezu allen transkriptionell aktiven Genen gefunden (Schneider et al. 2004). Die Dimethylierung des K4 dagegen wird nicht nur an Genpromotoren gefunden, sondern auch außerhalb dieser Bereiche (Bernstein et al. 2005). Explizit zu nennen sind hier die Homöotischen (Hox) Gene, bei denen die H3K4 Methylierung über weite Genbereiche wie auch in intergenischen Regionen lokalisiert wurde. Sie sind ein klassisches Beispiel für H3K4-regulierte Gene (Milne et al. 2002).

Auch bei der K4 Trimethylierung ist noch nicht genau geklärt, wie die Transkriptionsaktivierung erreicht wird. Es wurden allerdings einige Chromatin Remodeller gefunden, die durch spezielle Bindungsdomänen (s. 1.2.3) H3K4Me₃ erkennen können und die Transkription durch Öffnung der Chromatinstruktur ermöglichen. Ein Beispiel dafür ist CHD1 (für *chromo-ATPase/helicase-DNA-binding*), welches das methylierte K4 mit seiner Tandem-Chromodomäne bindet und die Chromatinstruktur durch seine Helikase/ATPase-Aktivität auf weitet (Flanagan et al. 2005). Ähnlich wirkt der ebenfalls ATP-abhängige Chromatin *Remodelling* Komplex NURF (*nucleosome remodelling factor*) (Wysocka et al. 2006). Dieser interagiert mit dem trimethylierten H3K4 durch die PHD-Finger seiner BPTF (*bromodomain and PHD finger transcription factor*) Untereinheit. Durch den Einsatz der SILAC Methode wurde kürzlich ein anderes Protein gefunden, das spezifisch das trimethylierte Lysin4 erkennt und mit aktiver Transkription in Verbindung steht, die TAF3 Untereinheit des basalen Transkriptionsfaktors TFIID (Vermeulen et al. 2007). Dabei wurde gezeigt, dass TAF3 den Histon N-Termini durch seinen PHD Finger erkennt und dass die Bindung von TFIID an H3 N-Termini durch Acetylierung an H3K9 und H3K14 verstärkt wird, während sie durch eine asymmetrische Dimethylierung an H3R2 vermindert wird. Somit ist ein direkter Zusammenhang zwischen der K4 Trimethylierung und der Rekrutierung basaler Transkriptionsfaktoren des Präinitiations-Komplexes gegeben.

Als mögliche Methyltransferase für die Modifikation an H3K4 kommen in Säugerzellen mindestens 10 verschiedene Enzyme in Frage (s. **Abbildung 1.7 A**). Alle diese Proteine haben die enzymatisch aktive SET (**Su**(var)3-9, **enhancer of zeste**, **trithorax**)-Domäne

gemeinsam, welche die Methylierung von K4 katalysiert (Ruthenburg et al. 2007). Dabei unterscheiden sich die Enzyme der MLL-Familie, deren SET-Domäne mit denen der Hefe Set1 oder der *Drosophila* Trx verwandt ist, von den restlichen Säuger H3K4 Methyltransferasen.

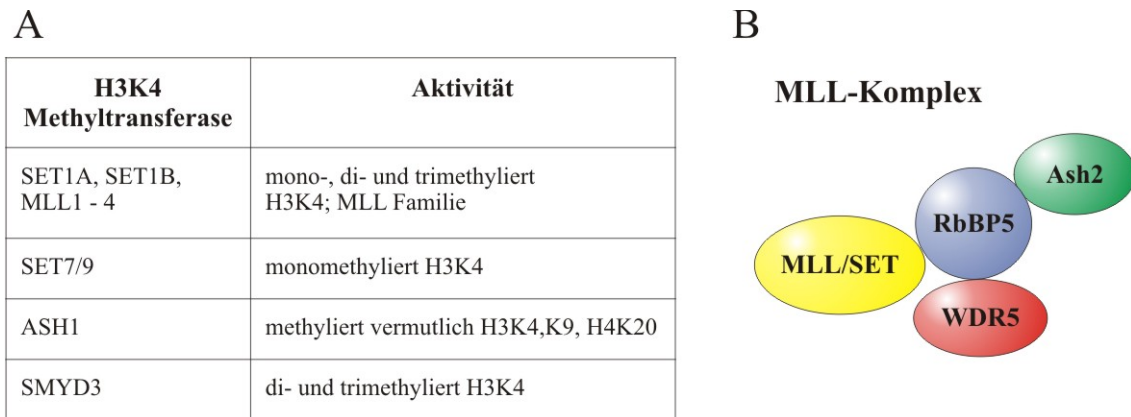


Abbildung 1.7: H3K4 Methyltransferasen (A) und der MLL-Kernkomplex (B)

(A) Auflistung der bekannten H3K4 Methyltransferasen in Säugerzellen und ihrer Aktivitäten. Für SET1B wurde noch keine Methyltransferaseaktivität nachgewiesen. (B) Zusammensetzung des MLL-Kernkomplexes. modifiziert nach (Ruthenburg et al. 2007)

Für die Trimethylierung des K4 sind die Enzyme (SET1A; MLL1-4) der MLL-Familie zuständig. Diese kommen wie viele andere Histon-modifizierenden Enzyme in unterschiedlichen Komplexen vor. Für die MLL Methyltransferasen konnte aber ein Kernkomplex mit fester Zusammensetzung gefunden werden (Milne et al. 2002; Wysocka et al. 2003). Dieser besteht aus den Untereinheiten MLL/SET, WDR5, Ash2 und RbBP5 (s. Abbildung 1.7 B). Es wurde gezeigt, dass die Untereinheiten WDR5, Ash2 und RbBP5 eine strukturelle Plattform bilden, welche die jeweilige enzymatisch aktive Untereinheit SET1A/MLL1-4 bindet. Außerdem wurde für diesen Kernkomplex H3K4 Methyltransferaseaktivität nachgewiesen (Dou et al. 2006). Während Ash2 und RbBP5 für die Struktur des Komplexes wichtig sind, nehmen MLL und WDR5 mit ihren Funktionen eine Sonderrolle ein.

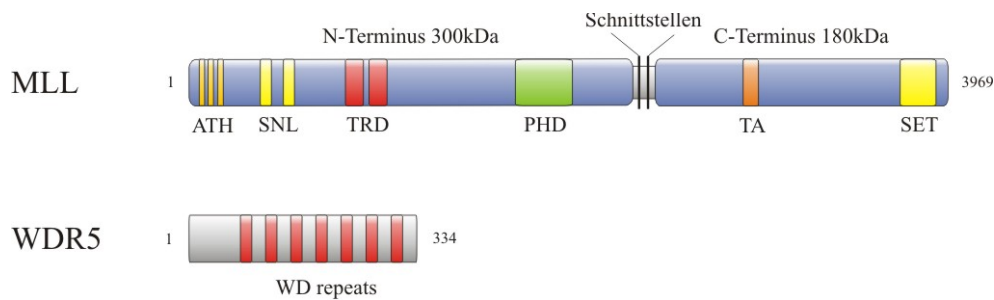


Abbildung 1.8: Sequenz von MLL und WDR5

ATH: AT-Hook; SNL: Nukleäre Lokalisationssequenz; TRD: Transkriptionelle Repressionsdomäne; PHD: Plant Homology Domain; TA: Transaktivierungsdomäne; SET: H3K4 Methyltransferase SET-Domäne. modifiziert nach (Krivtsov and Armstrong 2007).

Das MLL (mixed lineage leukemia) Protein ist 3969 Aminosäuren lang und wird an zwei Stellen durch Taspase 1 gespalten, was zu einem 300 kDa N-terminalen und einem 180 kDa C-terminalen MLL führt (Hsieh et al. 2003) (s. **Abbildung 1.8**). Während der N-Terminus durch seine Bindungsdomänen mit einer Vielzahl anderer Proteine interagiert, trägt der C-Terminus die enzymatische aktive SET-Domäne (Milne et al. 2002). Dieser C-Terminus ist ausreichend für die Assemblierung des enzymatisch aktiven MLL-Kernkomplexes (Dou et al. 2006).

Charakteristisch für das WDR5 (WD *repeat-containing protein* 5) Protein sind seine sieben aufeinanderfolgenden WD40 Domänen (s. **Abbildung 1.8**), die es dem Protein erlauben Histon N-Termini zu binden. Diese Domänen bestehen aus 4-strängigen antiparallelen β -Faltblättern und sind in einer Propeller-ähnlichen Struktur angeordnet in dessen Mitte die Bindungstasche für den Histon H3 N-Terminus liegt (Couture et al. 2006). Bisher wurde für WDR5 angenommen, dass es bevorzugt mit dimethyliertem K4 in Histon H3 assoziiert (Wysocka et al. 2005). Neuere Röntgenkristallstruktur- und Bindungsaffinitätsstudien weisen allerdings darauf hin, dass WDR5 nicht primär den Methylierungsstatus von K4 erkennt, sondern die benachbarten Aminosäuren A1, T3 und vor allem R2 bindet (Couture et al. 2006; Han et al. 2006; Ruthenburg et al. 2006). Dabei ragt das K4 aus der Bindungstasche des WDR5 heraus und ist frei zugänglich. Als Funktion für WDR5 im MLL-Komplex wurde daher die Möglichkeit diskutiert, dass es dafür zuständig ist, das K4 der enzymatischen Untereinheit MLL zu präsentieren.

Aktuelle Arbeiten demonstrieren, dass die Trimethylierung des K4 in Histon H3 maßgeblich an der Genregulation beteiligt, wenn nicht sogar entscheidend ist. Im Falle

der Hox Gene wurde gefunden, dass deren Genexpression durch die Promotor-Bindung der K4-Methyltransferase MLL reguliert wird (Milne et al. 2002).

Desweiteren konnte auch bei der β -Catenin-vermittelten Genaktivierung im Zusammenhang des Wnt-Signalweges eine Rolle der K4 Methylierung gefunden werden. So konnte in Kolonkarzinomzellen (HT29) für die Expression des Onkogens c-Myc nachgewiesen werden, dass an dessen Promotor die H3K4 Trimethylierung im Verlaufe der Transkription von c-Myc zunimmt. Im Gegensatz dazu wird die Menge an trimethyliertem K4 bei der Repression deutlich reduziert (Sierra et al. 2006).

Ein anderes Charakteristikum der K4 Methylierung lieferten Genom-weite Untersuchungen an Zielgenen des Transkriptionsfaktors c-Myc. Dort wurde eine eindeutige Korrelation zwischen aktiven Genpromotoren und euchromatischen Histonmodifikationen wie H3K4Me₃, H3K79Me₂, H3R26Me_{2a} und Histon H3 Acetylierung gefunden. Auffällig dabei war die völlige Abwesenheit dieser Gruppe von aktivierenden Modifikationen an Promotoren, welche von repressiven Histonmarkierungen wie H3K27Me₃, H4R3Me_{2s} und auch H3R2Me_{2a} besiedelt waren (Guccione et al. 2006). Dies ist ein Hinweis darauf, dass Mitglieder der repressiven Gruppe von Modifikationen einen negativen Einfluss auf das Zustandekommen der aktivierenden Modifikationsgruppe besitzen oder umgekehrt. Interessant für die vorliegende Arbeit war die Tatsache, dass mit dem dimethyliertem H3R2 eine Argininmethylierung unter den repressiven Modifikationen war, für welche die katalysierende PRMT noch unbekannt war.

1.2.5 Lysin 27 Methylierung und Polycomb-Komplexe

Eine Histonmodifikation, welche in engem Zusammenhang mit der H3K4 Methylierung steht, ist die Methylierung von K27 in Histon H3. Sie stellt vermutlich das repressive Pendant zu der aktivierenden H3K4 Methylierung dar (Jenuwein et al. 1998). Die Trimethylierung von K27 wird von der Gruppe der Polycomb-Komplexe (*Polycomb Repressive Complex*; PRC) katalysiert. Diese wurden zuerst mit der Repression der Homöotischen (Hox) Gene in Verbindung gebracht, allerdings wurden die Polycomb Komplexe inzwischen auch in Prozessen wie Zellproliferation, X Inaktivierung etc. entdeckt (Schuettengruber et al. 2007). Der exakte Mechanismus der Repression durch Polycomb Komplexe ist noch nicht restlos aufgeklärt. Bekannt ist aber, dass der PRC2 Komplex die enzymatische Aktivität besitzt, um K27 zu methylieren (Czermin et al.

2002). Vom PRC1 Komplex weiß man, dass dieser durch die Chromodomäne seiner Untereinheit *human Polycomb* (HPC) an H3K27Me₃ bindet (Fischle et al. 2003). Eine gefundene *in vitro* Kondensation der Chromatinstruktur durch den PRC1 Komplex konnte *in vivo* nicht bestätigt werden (Schwartz and Pirrotta 2007). Die Zusammensetzung beider Komplexe ist in Säugerzellen je nach Zelltyp unterschiedlich. Es konnten aber folgenden Kernkomponenten für die kanonischen Komplexe ausgemacht werden (s. **Abbildung 1.9**)

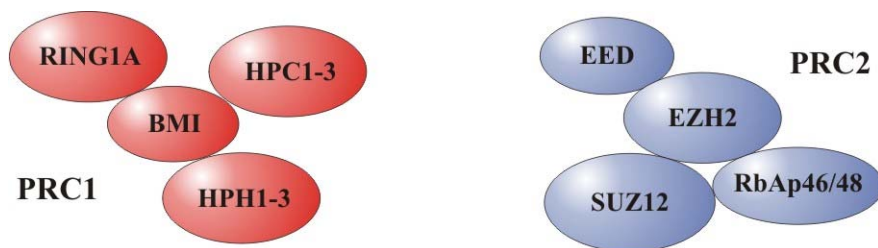


Abbildung 1.9: Zusammensetzung der humanen Polycomb Komplexe PRC1 und PRC2

nach (Schwartz and Pirrotta 2007) und (Schuettengruber et al. 2007). Dargestellt sind jeweils nur die Kernkomponenten der kanonischen Komplexe. Der ebenfalls zur Gruppe der Polycomb Komplexe gehörende PhoRC Komplex ist hier nicht aufgeführt.

Der PRC1 Komplex kann verschiedene HPC1-3 Isoformen enthalten, welche die Chromodomäne zur Erkennung der K27 Trimethylierung besitzen (Fischle et al. 2003). Die RING-Domänenproteine RING1A/B besitzen E3 Ubiquitinligaseaktivität welche durch BMI verstärkt wird (Buchwald et al. 2006). *Human polyhomeotic* (HPH) ist ein weiteres Mitglied des PRC1 Komplexes, welches in mehreren Isoformen vorkommt.

Dem PRC2 Komplex gilt im Rahmen dieser Arbeit besondere Aufmerksamkeit. Die Komponente EZH2 (*enhancer of zeste*) besitzt wie schon erwähnt die katalytische Aktivität um K27 in Histon H3 zu mono, di- oder trimethylieren (Czermin et al. 2002). Allerdings ist EZH2 außerhalb des Komplexes dazu nicht in der Lage. PRC2 Komplexe, welche Isoformen des EED (*embryonic ectoderm development*) enthalten, können zusätzlich H1K26 trimethylieren (Kuzmichev et al. 2004). SUZ12 (*suppressor of zeste*) wird für die Stabilität des gesamten Komplex und seine Funktion benötigt (Pasini et al. 2004). RbAp46/48 (*RB-associated protein*) sind Histonbindungsproteine die ebenfalls in anderen Komplexen mit Histonmodifikationsaktivitäten wie Acetyltransfer oder Deacetylierung gefunden wurden (HAT1 (Verreault et al. 1998);

NuRD (Zhang et al. 1998b)). Außerdem gehören diese Proteine zu Gruppe der *WD-repeat* Proteine (Qian and Lee 1995).

Genom-weite Untersuchungen der Rekrutierung von H3K27Me₃ sowie des PRC2-Komplexes haben gezeigt, dass diese nicht nur an reprimierten Hox Genen sondern auch an den Promotoren humaner embryonischer Stammzellregulatoren vorkommen (Lee et al. 2006). Ob aber diese Modifikation allein ausreicht, um die Rekrutierung des PRC1 zu bewerkstelligen, ist nicht vollständig geklärt. Die Repression dieser Gene durch Polycomb-Komplexe ist daher momentan ein Gebiet intensivster Forschung. Von Bedeutung für die vorliegenden Arbeit ist, dass die Trimethylierung des K27 in Histon H3 an bestimmten c-Myc Zielpromotoren zusammen mit der R2 Methylierung auftritt, was auf eine gegenseitige positive Beeinflussung hindeutet (Guccione et al. 2006).

1.3 Zielsetzung

Einige PRMTs methylieren neben anderen Substraten auch die N-Termini von Histonen. Da PRMT6 im Zellkern lokalisiert ist und dort Chromatin-assoziierte Proteine methyliert, war das Ziel dieser Arbeit festzustellen, ob auch Histone zu den Substraten von PRMT6 gehören.

Als Enzymquelle für die Untersuchungen der *in vitro* PRMT6-Aktivität wurde ein GST-Fusionsprotein verwendet und dessen Aktivität auf die einzelnen Kernhistone ermittelt. Die Identifikation der Methylierungsstellen in den Histon N-Termini wurde mittels Edman-Sequenzierung durchgeführt. Desweiteren sollte herausgefunden werden, ob PRMT6 einen der beiden Reaktionsschritte der Argininmethylierung bevorzugt katalysiert.

Um mögliche Bindungspartner für die von PRMT6 katalysierte Histonmodifikation am R2 in Histon H3 zu finden, kamen Histonpeptid-Pulldowns zu Einsatz. Dabei wurde unvoreingenommen nach Proteinen gesucht, welche eine durch die R2 Methylierung veränderte Bindung zu Histon N-Termini aufwiesen. Im Zusammenhang der Histonbindung sollte auch eine vermutete Beziehung zwischen der Funktion von PRMT6 und der des PRC2-Komplexes untersucht werden.

Da für PRMT6 ein Effekt auf die Expression bestimmter Gene gefunden wurde, sollte die Funktion der PRMT6-vermittelten H3R2 Methylierung bei der Genregulation charakterisiert werden. Die Untersuchung der *in vitro* Aktivität des PRMT6 ergab eine negative Beeinflussung derselben durch die Trimethylierung des K4 in Histon H3, welche eine Markierung für aktive Transkription darstellt.

Es sollte daher ein Effekt von PRMT6 auf die Transkriptionsregulation bei H3K4-regulierten Genen anhand der c-Myc Genexpression untersucht werden. Als Versuchsobjekt wurde die Repression des c-Myc Gens im Wnt-Signalweg verwendet. Die negative Beeinflussung der K4 Trimethylierung durch PRMT6 wurde durch die Auswirkungen der R2 Dimethylierung auf die katalytische Aktivität bzw. Histonbindung des K4 methylierenden MLL-Komplex untersucht. Die Funktion der PRMT6-vermittelten R2 Methylierung bei transkriptionsregulierenden Promotorprozessen sollte durch den Einsatz von Chromatinimmunpräzipitationen charakterisiert werden. Da der HoxA Genlokus dafür bekannt war durch H3K4 reguliert zu werden, wurde dieser Lokus zum Studium der Chromatinereignisse in verschiedenen humanen Zellen verwendet.

2 Material

2.1 Zelllinien

Die hier aufgeführten eukaryotischen Zelllinien wurden in dieser Arbeit verwendet:

- HEK 293: humane embryonale Nierenzelllinie;
transformiert mit dem Adenovirus 5; institutseigen
- MCF-7: humane Brustkarzinomzelllinie; institutseigen
 - MCF-7 WT: Wildtypzelllinie; institutseigen
 - MCF-7 TAP-PRMT6: MCF-7 stabil transfiziert mit
pNTAP-hPRMT6 Klon #11; (Hyllus et al. 2007)
 - MCF-7 Kontrolle: MCF-7 stabil transfiziert mit
pNTAP-Leervektor Klon #5; (Hyllus et al. 2007)
- HT-29: humane Kolonkarzinomzelllinie; (He et al. 1998)
 - HT-29 APC: HT-29 stabil transfiziert mit
pSAR-MT-APC
 - HT-29 β -Gal: HT-29 stabil transfiziert mit
pSAR-MT- β -Galactosidase
- NT2/D1: humane embryonale Teratokarzinomzelllinie; besitzt
neuronale Vorläuferzeleigenschaften; Differenzierung
durch Retinsäure induzierbar; (Lee and Andrews 1986)

2.2 Bakterienstämme

Zur Expression von Proteinen bzw. Plasmiden nutzte man folgende Bakterienstämme:

- BL21 DE3: E.coli Stamm zur Expression von His- bzw. GST-
Fusionsproteinen
- DH5 α : E.coli Stamm zur Präparation von Plasmid-DNA

2.3 Plasmide

Plasmid	Vektor	Gen	Größe	Resistenz	Tag	Herkunft
Flag-MLL1-HA	pLNCX	hMLL1	21582 bp	Ampicillin	His/Flag N-ter. HA C-ter.	(Yokoyama et al. 2002)
Flag-WDR5	pcDNA3.1 Hygro	hWDR5	6600 bp	Ampicillin	Flag N-ter. HA C-ter.	(Lee and Skalnik 2005)
HA-MBD3	pcDNA3	hMBD3	-	Ampicillin	HA N-ter.	AG Bauer
HA-PRMT6	pcDNA3	hPRMT6	6544 bp	Ampicillin	HA N-ter.	AG Bauer
His-PRMT6	pET 30 z	hPRMT6 AS 60-375	6367 bp	Kanamycin	His N-ter.	AG Bauer
His-Set7/9	pET-28b	hSet7/9	4671 bp	Kanamycin	His N-ter. Flag N-ter.	(Nishioka et al. 2002)
GST-GAR	pGex-2TK-P	hFibrillarin	5444 bp	Ampicillin	GST N-ter.	AG Herschman
GST-MLL1-Set	pGex-2TK-P	hMLL1	-	Ampicillin	GST N-ter.	(Rozenblatt-Rosen et al. 1998)
GST-PRMT1	pGex-4T-1	hPRMT1	6070 bp	Ampicillin	GST N-ter.	(Scott et al. 1998)
GST-PRMT4	pGex-4T-1	mPRMT4	8200 bp	Ampicillin	GST N-ter.	(Chen et al. 1999)
GST-PRMT6	pGex-2TK-P	hPRMT6	6091 bp	Ampicillin	GST N-ter.	AG Bauer

2.4 Peptide

Für den Einsatz als Substrate bei Histonmethyltransferase-Reaktionen oder als Bindungspartner bei Histonpeptid-Pulldowns wurden synthetische Histonpeptide verwendet. Diese waren kommerziell erhältlich bei Peptide Speciality Laboratories GmbH; Heidelberg.

Histon H4-Peptide:

H4 Sequenz AS1-30: SGRGK GGKGL GKGGA KRHRK VLRDN IQGIT

Peptid	Länge [aa]	Konz. [µg/µl]	MW [amu]	C-Terminus
H4	1 - 15	4	1933	Biotin, Cys
H4R3Me1	1 - 15	4	1947	Biotin, Cys
H4R3Me2 asym.	1 - 15	4	1961	Biotin, Cys

H3-Peptide:

H3-Sequenz AS1-30: ARTKQ TARKS TGGKA PRKQL ATKAA RKSAP

Peptid	Länge [aa]	Konz. [µg/µl]	MW [amu]	C-Terminus
H3	1 - 30	4	3270	Cys
H3R2Me1	1 - 30	4	3284	Cys
H3R2Me2	1 - 30	4	3298	Cys
H3K27Me2	1 - 30	4	3298	Cys
H3K27Me3	1 - 30	4	3312	Cys
H3	1 - 15	4	1665	Cys
H3K4Me2	1 - 15	4	1589	-
H3K4Me3	1 - 15	4	1707	Cys
H3K9Me1	1 - 15	4	1575	-
H3K9Me2	1 - 13	4	1493	Cys
H3K9Me3	1 - 15	4	1707	Cys

2.5 Antikörper

Folgende Primärantikörper wurden in der vorliegenden Arbeit für Immundetektion (WB), Immunpräzipitation (IP) oder Chromatin-IP (ChIP) verwendet.

Antigen	Firma/Herkunft	Spezies; Typ	Anwendung
APC	AG Behrens	Maus; monoklonal	WB: 1:1000
β-Tubulin	Chemicon	Maus; monoklonal	WB: 1:10000
Flag	Sigma	Maus; monoklonal	WB: 1:2500
H3 K4Me ₃	Cell Signaling	Kaninchen; polyklonal	ChIP: 5 µl
H3 R2Me ₂ asym	Upstate	Kaninchen; polyklonal	ChIP: 5 µl
HA	Roche	Maus; monoklonal	WB: 1:1000
HA (SC)	St. Cruz	Kaninchen; polyklonal	WB: 1:1000
IgG	Sigma	Kaninchen	IP: 1 µg ChIP: 0,4 µg

MBD3 (C-18)	St. Cruz	Ziege; polyklonal	WB: 1:1000
MLL C-t.	(Hsieh et al. 2003)	Kaninchen; polyklonal	WB: 1:1000 ChIP: 1,5 µl
MLL N-t.	(Hsieh et al. 2003)	Kaninchen; polyklonal	ChIP: 1,5 µl
PRMT6 C-t. Präimmunserum	AG Bauer	Kaninchen; polyklonal	ChIP: 15µl
PRMT6 C-t. Serum	AG Bauer	Kaninchen; polyklonal	ChIP: 15µl
PRMT6 C-t. affinitätsaufgereinigt	AG Bauer	Kaninchen; polyklonal	WB: 1:200 ChIP: 100µl
PRMT6 fl affinitätsaufgereinigt	AG Bauer	Kaninchen; polyklonal	WB: 1:200
RbAp46	AG Renkawitz	Kaninchen; polyklonal	WB: 1:1000
WDR5	(Wysocka et al. 2005)	Kaninchen; polyklonal	ChIP: 10µl

Die entsprechenden Sekundärantikörper für die Immundetektion sind in folgender Tabelle aufgeführt:

Antikörper	Spezies	Firma	Verdünnung
anti-Kaninchen-HRP	Esel	GE Healthcare	1:5000
anti-Maus-HRP	Schaf	GE Healthcare	1:5000
anti-Ziege-HRP	Rind	St. Cruz Biotechnology	1:1000

2.6 Oligonukleotide

2.6.1 qPCR-Primer

Gen	Schmelztemperatur	Sequenz 5'→3'
c-Myc	58°C 59°C	fwd: CAC CAG CAG CGA CTC TGA rev: CTG TGA GGA GGT TTG CTG TG
hGAPDH	60°C 60°C	fwd: AGC CAC ATC GCT CAG ACA C rev: GCC CAA TAC GAC CAA ATC C
hPRMT6	59°C 59°C	fwd: AGA CAC GGA CGT TTC AGG AG rev: CCA CTT TGT AGC GCA GCA G

hS14	60°C	fwd: GGC AGA CCG AGA TGA ATC CTC A
	60°C	rev: CAG GTC CAG GGG TCT TGG TCC

2.6.2 Chromatin-IP Primer

Gen	Position	Schmelz-temperatur	Sequenz 5'→3'
HoxA2 Promotor	+107 bis +451 344 bp	59°C	fwd: CGG TCC CCA TAC GGC TGT A rev: CAG GCT GGG AAT GGT CTG CT
HoxA2 Gen	+1952 bis +2169 217 bp	59°C	fwd: CAG GTT CCC TCG ACA GTC CC rev: AAA GGA GGG AAG GGG TAG GTC
HoxA5 Promotor	-176 bis +16 192 bp	58°C	fwd: CTC CAC CCA ACT CCC CTA TTA GTG rev: GTG CGT CTA TAG CAC CCT TGC
GAPDH Promotor	-353 bis -229 124 bp	60°C	fwd: CCA TCT CAG TCG TTC CCA AAG TCC rev: GAT GGG AGG TGA TCG GTG CT

2.6.3 siRNA

Gen	Sequenz 5'→3'
siLuciferase	sense: GAU UAU GUC CGG UUA UGU A antisense: UAC AUA ACC GGA CAU AAU C
siPRMT6	sense: GAG CAA GAC ACG GAC GUU U antisense: AAA CGU CCG UGU CUU GCU C

2.7 Radioaktive Substanzen

Die radioaktiv markierten S-Adenosyl-methionin Derivate wurden von der Firma GE Healthcare bezogen.

¹⁴ C-SAM:	S-Adenosyl-L-[methyl- ¹⁴ C]-methionin (25 nCi / µl) GE Healthcare CFA360
³ H-SAM:	S-Adenosyl-L-[methyl- ³ H]-methionin (1 µCi / µl) GE Healthcare TRK581

2.8 Substrate für Methyltransferase-Reaktionen

Histone aus Kalbsthymus:

- Kernhistone (H3, H2B, H2A, H4) 20 µg/µl; Roche Diagnostics GmbH
- H3, H2B, H2A, H4 (einzeln) 5 µg/µl; Roche Diagnostics GmbH

Rekombinante Drosophila-Histone (aufgereinigt aus *E.coli*):

- H3 1 µg/µl; AG Brehm IMT Univ. Marburg
- H4 2,5 µg/µl; AG Brehm IMT Univ. Marburg
- Histonoktamer 1 µg/µl; AG Brehm IMT Univ. Marburg
- mono-Nukleosomen 0,1 µg/µl; AG Brehm IMT Univ. Marburg

Synthetische Histon-Peptide:

- s. 2.4 Peptide

2.9 Standards

Proteinstandards:

- Prestained Protein Ladder; Fermentas GmbH
- Unstained Protein Ladder; Fermentas GmbH

3 Methoden

3.1 Zellkultur Methoden

3.1.1 Kultivierung von eukaryotischen Zellen

Material:

DMEM	4,5 g/l Glucose mit L-Glutamin; Lonza
McCoy's 5A	mit L-Glutamin; Lonza
Trypsin/EDTA	Lonza
Penicillin/Streptomycin	Lonza

Durchführung:

Das Kultivieren von humanen Zellen erfolgte bei 37°C und einem CO₂-Gehalt von 6 – 9 % im Inkubator. Das verwendete Standardmedium war DMEM mit 10 % (v/v) fötalem Kälberserum und 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin als Antibiotika. Einzig für HT29 Zellen wurde McCoy's 5A Medium anstatt DMEM verwendet. Das Arbeiten mit den Zellen erfolgte unter der Sterilbank um Kontaminationen zu vermeiden.

Zum Passagieren der Zellen wurde das Medium entfernt und die Zellen zweimal mit sterilem PBS gewaschen. Zum Ablösen der Zellen fügte man Trypsin/EDTA hinzu (5 ml pro 175 cm² Flasche) und inkubierte kurz bei 37°C. Sobald die Zellen nicht mehr adherierten, wurde Medium hinzugefügt und die Zellen gut resuspendiert. Anschließend wurde der gewünschte Anteil der Zellsuspension mit frischem Medium auf neue Kulturschalen / -platten verteilt und im Inkubator kultiviert.

3.1.2 Transfektion von Plasmid-DNA mit Calciumphosphat

Material:

CaCl ₂	2,5 M sterilfiltriert
HBS-Puffer	50 mM Hepes; 250 mM NaCl; 1,5 mM Na ₂ HPO ₄ ; pH 7,08 sterilfiltriert
TE-Puffer 1:10 verdünnt	1 mM Tris pH 8,0; 0,1 mM EDTA; sterilfiltriert
Medium	DMEM; 10 % (v/v) FCS; 1 % (v/v) PS

Durchführung:

Bei dieser Transfektionsmethode bildeten sich Calciumphosphat-DNA-Kristalle, welche von den Zellen aufgenommen werden konnten.

Die Zellen wurden einen Tag vorher so ausgesät, daß sie bei der Transfektion eine Konfluenz von 30 – 50 % erreicht hatten. Zum Ansetzen der Transfektionsmischung wurde die DNA in ein Gefäß vorgelegt, die TE-Verdünnung hinzugefügt und kurz gevortext. Der HBS-Puffer wurde dann unter vorsichtigem Mischen auf dem Vortex tropfenweise hinzupipettiert. Abhängig von der Kulturschale wurden folgende Mengen verwendet:

Kulturschale	DNA	TE Verdünnung	CaCl ₂	HBS-Puffer
60 mm	10 µg	225 µl	25 µl	0,25 ml
94 mm	25 µg	450 µl	50 µl	0,5 ml
145 mm	50 µg	900 µl	100 µl	1 ml

Nach 20 minütiger Inkubation bei RT wurde die Lösung tropfenweise auf die Zellen gegeben und die Schale geschwenkt. Nach 24 Stunden Kultivierung wurde das Medium durch Frisches ersetzt. Nach weiteren 24 – 48 Stunden konnten die Zellen geerntet werden.

3.1.3 Transfektion von Plasmid-DNA mit Polyethylenimin

Material:

PEI	0,1 % (v/v) Polyethylenimin
PBS	137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na ₂ HPO ₄ ; 2 mM NaH ₂ HPO ₄ ; pH 7,4; sterilfiltriert
Medium	DMEM; 10 % (v/v) FCS; 1 % (v/v) PS

Durchführung:

Bei dieser Methode wurde Polyethylenimin benutzt, ein basisches 25kDa Polymer, das an Nukleinsäuren bindet und dadurch Partikel bildet, die von den Zellen aufgenommen werden können.

Die Zellen hatten eine Konfluenz von ca. 50% zum Zeitpunkt der Transfektion. Die Plasmid-DNA wurde in ein Gefäß mit PBS gegeben. Parallel wurde das PEI in ein anderes Gefäß mit PBS pipettiert. Die Mengen entsprachen dabei folgender Tabelle:

Kulturschale	DNA-Lösung	PEI-Lösung
60 mm	7,5 µg DNA + 150 µl PBS	7,5 µl PEI + 150 µl PBS
94 mm	15 µg DNA + 300 µl PBS	15 µl PEI + 300 µl PBS
145 mm	45 µg DNA + 900 µl PBS	45 µl PEI + 900 µl PBS

Die Lösungen wurden für 5 min bei RT inkubiert, miteinander gemischt und wiederum für 15 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Transfektionslösung zu den Zellen getropft und die Schale kurz geschwenkt. Nach 3 stündiger Inkubation ersetzte man das Medium durch Frisches und erntete die Zellen nach insgesamt 48 Stunden.

3.1.4 Transfektion von siRNA mit Dharmafect

Material:

siRNA	20 µM
Dharmafect 1	Dharmacon
Optimem	Invitrogen
Medium	McCoy's 5A; 10 % (v/v) FCS

Durchführung:

Um HT29 Koloncarcinomzellen mit siRNA zu transfizieren, hat sich der Einsatz des Transfektionsreagenz Dharmafect als optimal erwiesen.

Die Zellen wurden in 6well Platten derart ausgesät, daß sie zum Zeitpunkt der Transfektion eine Konfluenz von 20 – 30 % hatten. In einem Gefäß wurde die siRNA in Optimem-Medium gemischt. In einem weiteren Gefäß mischte man Dharmafect 1 mit Optimem-Medium. Beide Ansätze wurden für 5 min bei RT inkubiert, miteinander vermischt und für 20 min bei RT inkubiert. Vor Zugabe der Transfektionslösung zu den Zellen wurde das Medium entfernt und durch Medium ohne Antibiotika ersetzt. Die Transfektionslösung wurde dann zu den Zellen getropft. Die einzusetzenden Menge für ein 6 well Gefäß betrugen:

Methoden

- 10 µl siRNA + 100 µl Optimem
- 6 µl Dharmafect 1 + 194 µl Optimem
- 1,7 ml Medium ohne Antibiotika

Nach 48 Stunde Inkubation konnten die Zellen geerntet werden.

3.1.5 Induktion von HT29-Zellen mit Zinkchlorid

Material:

Zinkchlorid-Lösung 10 mM ZnCl₂

Durchführung:

Spezielle HT29 Zellklone (s. 2.1), die ein stabil transfiziertes Plasmid mit einem Zink-induzierbaren MT(metallothionein)-Promotor trugen, konnten durch Zugabe von Zinkchloridlösung zur Expression dieses Plasmids induziert werden. Dies wurde verwendet, um das Protein APC bzw. als Kontrolle β -Galactosidase induzierbar zu exprimieren.

Die HT29 Zellen wurden einen Tag vorher so ausgesät, daß sie zum Zeitpunkt der Induktion eine Konfluenz von 20 - 40 % erreicht hatten. Die Induktion erfolgte durch Zugabe von Zinkchlorid-Lösung zu einer Endkonzentration von 200 µM im Medium. Nach Ablauf der erwünschten Induktionszeitpunkte wurden die Zellen entweder zur RNA- (s. 3.2.6) oder Protein-Isolierung (s. 3.3.15) geerntet.

3.1.6 Differenzierung von NT2/D1 Zellen

Material:

ATRA 100 mM all-*trans*-Retinsäure in DMSO; Sigma-Aldrich

Durchführung:

Die Teratokarzinomzelllinie NT2/D1 konnte durch Behandlung mit Retinsäure zur Differenzierung gebracht werden.

Die NT2/D1 Zellen wurden ausgesät, so dass sie eine Konfluenz von nicht mehr als 50% besaßen. Man gab ATRA in einer 1:100.000 Verdünnung zum Medium hinzu (Endkonzentration: 1µM). Die Zellen wurden unter stetigen ATRA-Behandlung für die

angegebene Zeit (3 bis 12 Tage) weiterpassagiert und nach Abschluss der Differenzierung geerntet.

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Herstellung kompetenter Bakterien

Material:

SOB-Medium	2 % (w/v) Trypton; 0,5 % (w/v) Hefeextrakt; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl ₂ ; 10 mM MgSO ₄ ; pH 7,0
RF1-Puffer	100 mM KCl; 50 mM MnCl ₂ ; 30 mM K-Acetat; 10 mM CaCl ₂ ; 15 % (v/v) Glycerol; pH 5,8 mit Essigsäure
RF2-Puffer	10 mM MOPS; 10 mM KCl; 75 mM CaCl ₂ ; 15 % (v/v) Glycerol; pH 6,8

Durchführung:

Die Bakterien (DH5 α oder BL21 DE3) wurden auf Agarplatten frisch ausgestrichen und zum Ansetzen einer 2 ml SOB-Medium Übernachtskultur verwendet. Aus dieser wurde eine Wachstumskultur mit 200 ml SOB-Medium angeimpft und bis zu einer OD von 0,6 wachsen gelassen. Die Bakterien wurden dann auf Eis gekühlt und bei 3000 U/min und 4°C für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 67 ml RF1-Puffer resuspendiert. Die Bakteriensuspension inkubierte man für 15 min auf Eis und zentrifugierte anschließend bei 3000 U/min für 15 min bei 4°C ab. Das erhaltene Pellet wurde in 16 ml RF2-Puffer aufgenommen, resuspendiert und 15 min lang auf Eis inkubiert. Danach wurden die Bakterien in 200 μ l Aliquots verteilt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

3.2.2 Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration

Die Konzentration einer DNA- bzw. RNA – Probe in ng / μ l wurde mittels eines NanoDrop ND-1000 bestimmt. Dazu wurde 1 μ l der zu bestimmenden Probe im Nanodrop vermessen.

3.2.3 Transformation kompetenter Bakterien

Material:

LB-Medium 1 % (w/v) Trypton; 0,5 % (w/v) Hefeextrakt;
 177 mM NaCl; pH 7,0

Agarplatten

Durchführung:

Die benötigte Menge Plasmid-DNA (50 ng – 1 µg) wurde zu einer 200 µl Suspension der zu transformierenden kompetenten Bakterien (s. 3.2.1) pipettiert. Anschließend erfolgte die Inkubation des Plasmids mit den Bakterien für 20 min auf Eis. Die Bakterien wurden dann für 1,5 min bei 42°C erhitzt und sofort auf Eis gekühlt. Man fügte 400 – 600 µl LB-Medium hinzu und inkubierte bei 37°C für 20 – 40 min. Die Bakteriensuspension wurde dann verwendet um Übernachtskulturen anzupflanzen oder direkt auf Agarplatten ausgestrichen.

3.2.4 Agarose-Gelelektrophorese

Material:

TBE-Puffer 89 mM Tris; 0,9 mM EDTA; 89 mM Borsäure; pH 8,4
Ethidiumbromid 10 % (w/v)
Probenpuffer 6 x Orange G; Fluka
Agarose SeaKem Agarose LE; Lonza

Durchführung:

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde verwendet um DNA-Fragmente nach ihrer Größe aufzutrennen und zu identifizieren. Dies kam beispielsweise bei einer ChIP (s. 3.3.27) zum Einsatz.

Die benötigte Menge Agarose wurde in TBE-Puffer aufgeköcht. Nach Abkühlen der Lösung auf ca. 60°C wurden pro 100 ml Lösung 5 µl Ethidiumbromid hinzugefügt und das Gel in eine Form gegossen. Die zu untersuchende DNA wurde mit Probenpuffer versetzt und auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 150 – 180 V für 30 – 60 min. Die aufgetrennten DNA-Fragmente wurden unter UV-Licht analysiert.

3.2.5 Präparative Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Material:

LB-Medium	1 % (w/v) Trypton; 0,5 % (w/v) Hefeextrakt; 177 mM NaCl; pH 7,0
TE-Puffer	10 mM Tris pH 8,0; 1mM EDTA
Antibiotika	Ampicillin bzw. Kanamycin
Isopropanol	
Ethanol	70 % (v/v) und 100 % (v/v) ; p. a.
NaCl-Lösung	5 M
Jetstar Kit; Genomed	Puffer E1 –E6

Durchführung:

Kompetente DH5 α Bakterien (s. 3.2.1) wurden mit dem zu exprimierenden Plasmid transformiert (s. 3.2.3) und zum Animpfen von 300 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotika verwendet. Die Bakterien wurden über Nacht bei 37°C wachsen gelassen und anschließend geerntet. Das Pellet wurde in 10 ml Puffer E1 resuspendiert, mit 10 ml Puffer E2 versetzt und vorsichtig gemischt. Nach 5 minütiger Inkubation bei RT erfolgte die Neutralisation mit 10 ml Puffer E3 und erneutem Mischen. Diese Suspension wurde für 20 min auf Eis inkubiert und dann bei 5500 U/min und 4°C für 20 min zentrifugiert. Der Überstand wurde filtriert und auf eine mit 30 ml Puffer E4 equilibrierte Säule gegeben. Nachdem der Überstand durch die Säule gelaufen ist, wurde diese mit 60 ml Puffer E5 gewaschen. Die gebundene DNA wurde mit 15 ml Puffer E6 eluiert und aufgefangen. Zum Fällern der DNA wurde das Eluat mit 10,5 ml Isopropanol versetzt und gut gemischt. Nach 5 – 10 min Inkubation bei RT zentrifugierte man die ausgefallene DNA bei 5500 U/min für 20 min ab. Das DNA-Pellet wurde an der Luft getrocknet und in 300 μ l TE-Puffer resuspendiert. Man gab 15 μ l NaCl-Lösung hinzu und liess diese Lösung in 100% Ethanol fließen. Durch vorsichtiges Schütteln des Gefäßes bildete sich eine DNA-Flocke, die zweimal durch Überführen in 70% Ethanol gewaschen wurde. Als letztes wurde die Flocke in ein neues Gefäß überführt und getrocknet. Die DNA wurde in 200 – 400 μ l TE-Puffer aufgenommen und die DNA-Konzentration der Lösung bestimmt (s. 3.2.2).

3.2.6 Präparation von Gesamt-RNA aus eukaryotischen Zellen

Material:

peqGold Total RNA Kit; Peqlab

OBI DNaseI Digest Kit; Peqlab

Durchführung:

Die Isolierung und Aufreinigung von Gesamt-RNA aus eukaryotischen Zellen erfolgte mittels des peqGold Total RNA Kit. Die experimentelle Vorgehensweise wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Um Verunreinigungen mit genomischer DNA zu minimieren wurde ein DNase 1 Schritt (OBI DNaseI Digest Kit) eingefügt, welcher ebenfalls laut Herstellerangaben durchgeführt wurde. Die RNA-Konzentration der Probe wurde am Nandrop (s. 3.2.2) bestimmt.

3.2.7 Reverse Transkriptase Reaktion

Material:

dNTP-Mix	je 10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP
Primer	oligo dT 17mer; 0,5 µg/µl
MMLV rev. Transkriptase	MMLV Reverse Transcriptase Kit; Invitrogen
5 x FS-Puffer	MMLV Reverse Transcriptase Kit; Invitrogen
RNase-Inhibitor	Ribolock Ribonuclease Inhibitor (40 U/µl); Fermentas
DTT	100 mM
Thermocycler; Biometra	

Durchführung:

Um bestimmte mRNA-Sequenzen mit Hilfe der PCR quantifizieren zu können, musste die RNA zuerst durch die reverse Transkription in cDNA umgeschrieben werden.

Von der präparierten Gesamt-RNA (s. 3.2.6) wurden 0,5 – 2 µg für die Reaktion eingesetzt. Das Volumen der Probe wurde mit H₂O_{bid} auf 10 µl aufgefüllt. Zu dieser Lösung pipettierte man 1 µl dNTP-Mix, 1 µl oligo dT Primer und 4 µl H₂O_{bid} hinzu. Der Ansatz wurde für 5 min bei 65°C im Thermocycler inkubiert. Anschließend fügte man 0,7 µl MMLV reverse Transkriptase, 0,5 µl RNase-Inhibitor, 2 µl 100 mM DTT, 5 µl 5 x FS-Puffer und 2 µl H₂O_{bid} hinzu. Für die reverse Transkription wurde die Probe für 1 Stunde im Thermocycler auf 37°C erwärmt. Das Enzym wurde anschließend durch

Erhitzen für 15 min auf 75°C inaktiviert. Die erhaltene cDNA konnte dann für die quantitative PCR (s. 3.2.8) eingesetzt werden.

3.2.8 Quantitative Polymerasekettenreaktion (qPCR)

Die Standard-PCR dient zur Amplifizierung einer spezifischen DNA-Sequenz. Dabei wird diese Sequenz von einem gegenläufigen Primerpaar erkannt (annealing) und im folgenden Schritt von einer DNA-Polymerase kopiert (elongation). Diese Kopie fungiert nun als Matrize für den nächsten Amplifizierungszyklus, wodurch die Ursprungssequenz Schritt für Schritt vervielfältigt wird. Durch den Einsatz von spezifischen Primern kann die Anwesenheit einer bestimmten DNA-Sequenz in einer Probe qualitativ nachgewiesen werden. Dies geschieht durch Anfärben der DNA im Agarosegel mittels interkalierendem Ethidiumbromid.

Im Gegensatz zur Standard-PCR bei der die amplifizierte DNA erst nach dem Lauf nachgewiesen werden kann, wird bei der quantitativen PCR die neugebildete DNA schon während des Experiments detektiert. Dazu wird zu der Reaktion ein Fluoreszenzfarbstoff hinzugegeben (SYBR Green), welcher in die DNA interkaliert und dadurch bei Anregung mit 494 nm Licht mit einer Wellenlänge von 521 nm emittiert. Somit ist es möglich die Anwesenheit wie auch die Menge von amplifizierter DNA in Echtzeit („real-time“) während der PCR zu detektieren. Die eigentliche Quantifizierung erfolgte dadurch, dass jeder Probe ein bestimmter Zykluswert (C_T -Wert; threshold cycle) zugewiesen wurde bei dem die Emission des Farbstoffs einen festgelegten Schwellenwert überschreitet.

Quantitative PCR zur Quantifizierung von cDNA:

Material:

Primer-Mix	2,5 mM Vorwärts-Primer; 2,5 mM Rückwärts-Primer
cDNA-Mix	0,5 µl cDNA-Lösung (s. 3.2.7) in 6 µl H ₂ O _{bid}
PCR-Mix	Absolute QPCR SYBR Green Mix; Abgene
qPCR-cycler MX500 Pro; Stratagene	

Durchführung:

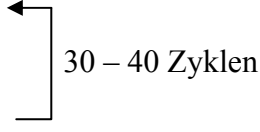
Um Rückschlüsse auf die Menge bestimmter mRNA-Mengen in Zellen führen zu können, wurde die entsprechende cDNA (s. 3.2.7) mittels der qPCR quantifiziert.

Methoden

Der PCR-Ansatz setzte sich dabei wie folgt zusammen:

- 1 µl Primer-Mix
- 6 µl cDNA-Mix
- 12 µl PCR-Mix
- 8 µl H₂O_{bid}

Dieser wurde in 96well qPCR-Platten pipettiert und diese dann versiegelt. Die PCR verlief in einem Zwei-Stufen-Programm nach folgendem Temperaturschema:

- 15 min 95°C
 - 15 sec 95°C
 - 30 sec 63 - 65°C
- 
- 30 – 40 Zyklen

Nach erfolgtem qPCR-Lauf erhielt man für jede Probe den zugehörigen C_T-Wert. Die Auswertung erfolgte nach der $\Delta\Delta C_T$ -Methode. Hierbei wurde die Menge DNA des zu untersuchenden Gens X mit der Menge eines Standardgens STD verglichen, typischerweise war STD ein Haushaltsgen wie GAPDH. Der ΔC_T -Wert berechnete sich also wie folgt:

$$\Delta C_T(X) = C_T(X) - C_T(STD)$$

So erhielt man die relative DNA-Menge des Gens X bezogen auf das Standardgen. Wollte man die DNA Mengen von Gen X bei verschiedenen Experimenten untereinander vergleichen, wurde für jede Bedingung A bzw. B der jeweilige $\Delta C_T(X)$ -Wert berechnet.

$$\Delta C_T(X)_A = C_T(X)_A - C_T(STD)_A \text{ bzw. } \Delta C_T(X)_B = C_T(X)_B - C_T(STD)_B$$

$$\Delta\Delta C_T(X) = \Delta C_T(X)_B - \Delta C_T(X)_A$$

Die relative Änderung der DNA Menge von Gen X ergab sich dann aus:

$$\text{fache Expression} = 2^{\Delta\Delta C_T(X)}$$

Da die Proben in Triplikaten untersucht wurden, konnte man mit Hilfe der erhaltenen Standardabweichungen σ eine Fehlerberechnung nach dem Fehlerfortpflanzungsgesetz erstellen. Der resultierende Fehler derfachen Expression ergab sich aus:

$$\text{Fehler} = 2^{\Delta\Delta CT} \times \ln 2 \times \sqrt{(\sigma_X^2 + \sigma_{STD}^2)}$$

Quantitative PCR zur Quantifizierung von Chromatin-DNA:

Material:

Primer-Mix	2,5 mM Vorwärts-Primer; 2,5 mM Rückwärts-Primer
Chromatin-Mix	0,6 µl aufgereinigtes oder „Input“-Chromatin(s. 3.3.27) in 6 µl H ₂ O _{bid}
PCR-Mix	Absolute QPCR SYBR Green Mix; Abgene
qPCR-cycler MX500 Pro	Stratagene

Durchführung:

Zur Quantifizierung der Chromatinmengen aus ChIP-Experimenten wurde das immunpräzipitierte wie auch das „Input“-Chromatin mittels qPCR analysiert.

Der PCR-Ansatz setzte sich dabei wie folgt zusammen:

- 1 µl Primer-Mix
- 6 µl Chromatin-Mix
- 12 µl PCR-Mix
- 8 µl H₂O_{bid}

Die PCR verlief in einem Drei-Stufen-Programm:

- 15 min 95°C
 - 40 sec 95°C
 - 30 sec 60°C
 - 30 sec 72°C
- 30 – 40 Zyklen
-

Die Menge an immunpräzipitiertem Chromatin $C_T(X)$ wurde dann als Prozent-Input auf die Gesamtmenge des eingesetzten Inputchromatins $C_T(INP)$ bezogen.

$$\% \text{-Input} = 2^{(C_T(INP) - C_T(X))}$$

Als Fehler ergab sich:

$$\text{Fehler} = \% \text{-Input} \times \ln 2 \times \sqrt{(\sigma_X^2 + \sigma_{INP}^2)}$$

Bei einigen ChIP-Experimenten wurde das immunpräzipitierte Chromatin $C_T(X)$ nicht auf den Input, sondern auf das durch den Kontrollantikörper IgG präzipitierte Chromatin $C_T(\text{IGG})$ bezogen.

$$\text{relative Anreicherung (IgG)} = 2^{(C_T(\text{IGG}) - C_T(X))}$$

Als Fehler ergab sich entsprechend:

$$\text{Fehler} = \text{relative Anreicherung (IgG)} \times \ln 2 \times \sqrt{(\sigma_X^2 + \sigma_{IGG}^2)}$$

3.3 Biochemische Methoden

3.3.1 Bestimmung der Proteinkonzentration (Bradford)

Material:

Bradford-Reagenz	0,01 % (w/v) Coomassie Brilliant Blau G-250; 4,75 % (v/v) Ethanol p.A.; 8,5 % (v/v)
Phosphorsäure	
BSA-Standard	1 mg/ml Bovines Serumalbumin

Durchführung:

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration in Lösungen wurde die Methode nach Bradford (Bradford 1976) verwendet. Dabei wird die charakteristische Verschiebung des Absorptionsspektrums des Triphenylmethanfarbstoff Coomassie Brilliant Blau von 470 nm nach 595 nm bei Bindung an Proteine photometrisch gemessen.

In Plastikkuvetten wurden 100 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid}}$ vorgelegt und Standardwerte mit BSA-Konzentrationen von 1-10 μg in Doppelbestimmung erstellt. Die zu bestimmende Proteinprobe pipettierte man ebenfalls in Duplikaten. Nach Zugabe von 900 μl Bradford-Reagenz wurde die Absorption der Proben und Standards bei 595 nm vermessen. Mittels Regressionsrechnung wurde eine Standardgerade erstellt und anhand dieser die Proteinkonzentration der unbekannten Probe errechnet.

3.3.2 Konzentrierung von Proteinen

Material:

Strataclean Resin; Stratagene

Durchführung:

Um Proteine aus Lösungen aufzukonzentrieren, beispielsweise zum Beladen von Polyacrylamidgelen wurden diese an Strataclean - Resin gebunden.

Dazu wurde die Proteinlösung mit entsprechenden Mengen Strataclean Resin (max. Bindungskapazität 10 µg / µl Resin) versetzt und 15 min bei RT auf dem Rad inkubiert. Die Probe wurde anschließend bei 1 min bei 6000 U/min zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Resinpellet in SDS-Probenpuffer aufgenommen. Zum Beladen eines Polyacrylamidgels musste das Resin ebenfalls in die Geltasche pipettiert werden.

3.3.3 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (PAGE)

Material:

SDS-Laufpuffer	192 mM Glycin; 25 mM Tris; 0,1% SDS; pH 8,3
Acrylamid/Bisacrylamidlösung	30 % (v/v) Acrylamid / (v/v) Bisacrylamid
Sammelgel-Puffer	1 M Tris pH 6,8
Trenngel-Puffer	1 M Tris pH 8,8
SDS-Lösung	20 % SDS
4x SDS-Probenpuffer	250 mM Tris pH 6,8; 2 % SDS; 20 % β-Mercaptoethanol; 40 % Glycerin; 0,1 % Bromphenolblau
APS	10 % (w/v) Ammoniumpersulfat
TEMED	Tetramethylethyldiamin
Butanol	wassergesättigtes n-Butanol
Elektrophoresekammer	Mini-Protean 3 System; Bio-Rad

Durchführung:

Zur größenabhängigen Auftrennung von Proteinen wurde die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach der Methode von Laemmli (Laemmli 1970) verwandt.

Die Glasplatten und Kämme der Gellaufapparaturen wurden mit Ethanol gesäubert und zusammengebaut. Die Trenngellösung wurde entsprechend der erwünschten Acrylamid-

Methoden

konzentration gemischt, mit APS und TEMED versetzt und zwischen die Glasplatten gegossen. Anschließend wurde die Lösung mit Butanol überschichtet und die Polymerisation des Acrylamids abgewartet. Das Butanol wurde abgegossen, die Sammelgellösung mit APS und TEMED auf das Trenngel gegossen und der Kamm in das Sammelgel gesteckt. Nach erfolgter Polymerisation wurde der Kamm herausgezogen, das Gel in die entsprechende Elektrophoresekammer eingebaut und diese mit SDS-Laufpuffer gefüllt. Die Proteinproben wurden mit 4xSDS-Probenpuffer versetzt, 5 min bei 95°C erhitzt und danach in die Geltaschen pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte bei 180 V für 1-2 Stunden bei RT bzw. bei 12 mA über Nacht.

3.3.4 Färbung von Proteingelen mittels Coomassie

Material:

Färbelösung	25 % (v/v) Ethanol; 10 % (v/v) Essigsäure 0,25 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250
Entfärbelösung	25 % (v/v) Ethanol; 10 % (v/v) Essigsäure

Durchführung:

Zur Detektion von stark konzentrierten Proteinen in Polyacrylamidgelen ($> 0,5 \mu\text{g}$) wurden die Banden mit dem Farbstoff Coomassie Brilliant Blue sichtbar gemacht, welcher sich an basische Seitenketten in Proteinen lagert.

Nach erfolgter Gelelektrophorese wurde das Gel je nach Dicke und Konzentration $\frac{1}{2}$ - 2 Stunden in Coomassiefärbelösung bei RT inkubiert. Zum Entfärben wurde das Gel dann in Entfärbelösung geschwenkt bis die gewünschte Intensität der Proteinenbanden erreicht war.

3.3.5 Färbung von Proteingelen mittels colloidalem Coomassie

Material:

Färbekit	Novex Colloidal Blue Staining Kit; Invitrogen
Fixierlösung	50 % (v/v) Methanol; 10 % (v/v) Essigsäure
Färbelösung	20 % (v/v) Stainer A; 5 % (v/v) Stainer B 20 % (v/v) Methanol

Durchführung:

Zur Identifizierung von Proteinen mit Hilfe der Massenspektrometrie wurden die Gele mittels colloidalem Coomassie gefärbt.

Das Proteingel wurde für mindestens 2 Stunden in Fixierlösung geschwenkt. Die Fixierlösung wurde entfernt und das Gel über Nacht bei RT in Färbelösung inkubiert. Nach erfolgter Färbung schwenkte man das Gel in H_2O_{bid} bis der Hintergrund klar war. Zur massenspektroskopischen Untersuchung bestimmter Proteinbanden wurden diese aus dem Gel ausgeschnitten und mit 150 μ l H_2O_{bid} in einem 0,2 ml PCR-Gefäß bei -20°C gelagert.

3.3.6 Silberfärbung von Proteingelen**Material:**

Fixierlösung	50 % (v/v) Ethanol; 12,5 % (v/v) Essigsäure
Lösung 1	50 % (v/v) Ethanol
Lösung 2	30 % (v/v) Ethanol
Lösung 3	0,8 mM Natriumthiosulfat penta-hydrat
Färbelösung	0,2 % (w/v) Silbernitrat; 0,072 % (v/v)
Formaldehyd	
Entwicklerlösung	6 % (w/v) Natriumcarbonat
	16 μ M Natriumthiosulfat penta-hydrat
	0,05 % (v/v) Formaldehyd

Durchführung:

Bei geringen Proteinmengen in Polyacrylamidgelen wurde die Silberfärbung angewandt, welche auf der Reduktion von Silber durch Proteine basiert und die Detektion von Proteinbanden bis zu 0,1 ng erlaubt.

Das Gel wurde für mindestens 2 Stunden oder über Nacht in Fixierlösung geschwenkt. Danach erfolgte zweimaliges Waschen in Lösung 1 für je mindestens 20 min und einmaliges Waschen in Lösung 2 für ebenfalls mindestens 20min. Das Gel wurde für 60 sec in Lösung 3 geschwenkt und dann dreimal mit H_2O_{bid} für 20 sec gewaschen. Das Gel wurde dann für 20 min in Färbelösung inkubiert und anschließend erneut dreimal 20 sec lang mit H_2O_{bid} gewaschen. Die Visualisierung der Banden erfolgte in Entwicklerlösung für ca. 5-10 min und wurde nach Erreichen der erwünschten Intensität durch zweimaliges Waschen für ca. eine Minute in H_2O_{bid} unterbrochen. Zum

endgültigen Abbrechen der Reaktion wurde das Gel in Fixierlösung inkubiert und in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid}}$ gelagert.

3.3.7 Proteintransfer / Western Blot (nass)

Material:

Blot-Puffer	20 % (v/v) 10x SDS-Laufpuffer (s. 3.3.3)
	20 % (v/v) Methanol
Elektrophoresekammer	Mini-Protean 3 System; Bio-Rad
PVDF- oder Nitrocellulose –Membran	
3MM Whatmanpapier	

Durchführung:

Mit Hilfe dieser Methode wurden Proteine nach der SDS-Gelelektrophorese (s. 3.3.3) auf eine Membran transferiert und dort immobilisiert. Dies erlaubte die Identifikation dieser Proteine mittels Immunodetektion (s. 3.3.10), Ponceau-Färbung (s. 3.3.9) oder Fluorographie (s. 3.3.21). Beim Transfer auf eine PVDF-Membran musste diese erst durch kurzes Schwenken in Methanol benetzt werden, wobei die hydrophobe Membran dem wässrigen Medium angepasst wird. Das Gel und die Membran wurden dann nach folgendem Schema in die Blotapparatur eingebaut:

Anode

Elektrophoreseschwamm
2 x Whatmanpapier
Membran
Polyacrylamidgel
2 x Whatmanpapier
Elektrophoreseschwamm

Kathode

Der Transfer aus 1,5 mm dicken Gelen erfolgte bei 45 V für 1,5 h. Bei Peptiden bzw. großen Proteinen wurde die Transferdauer entsprechend angepasst, 30 min für Peptide und 3h für große Proteine (> 120 kDa).

3.3.8 Proteintransfer / Western Blot (halbtrocken)

Material:

Blot-Puffer	25 mM Tris; 150 mM Glycin; 10 % (v/v) Methanol; pH 8,3
-------------	---

PVDF-Membran

3MM Whatmanpapier

Semi-Dry-Blotter Maxi; Roth

Durchführung:

Der Gebrauch des halbtrockenen Proteintransfers kam zum Einsatz bei großen Polyacrylamidgelen oder bei anschließender Immundetektion mit Antikörpern, welche dies verlangten.

Die PVDF-Membran musste auch hierbei in Methanol zuerst benetzt werden. Der Aufbau des Blots erfolgte dann wie folgt:

Anode

3 x Whatmanpapier

Membran

Polyacrylamidgel

3 x Whatmanpapier

Kathode

Der Transfer wurde bei 1-2 mA pro cm² Gelfläche für 90 min durchgeführt. Bei großen Proteinen (> 120 kDa) erhöhte sich die Transferdauer auf 3 Stunden.

3.3.9 Ponceau-Färbung von Membranen

Material:

Ponceau S Lösung; Sigma-Aldrich 0,1 % (w/v) Ponceau S; 5 % Essigsäure
Methanol

Durchführung:

Mit Hilfe des Ponceaufarbstoffs lassen sich Proteine direkt auf Blotmembranen anfärben. Die Membran wurde dazu für 15 min Minuten in der Ponceau S Lösung geschwenkt und anschließend mit H_2O_{bid} gewaschen bis die Proteinbanden deutlich

Methoden

sichtbar wurden. Beim Anfärben von Peptiden wurde zum Entfärben Methanol verwendet.

3.3.10 Immundetektion

Material:

TBS	50 mM Tris pH 7,6; 150 mM NaCl
TBS / Tween	0,5 % (v/v) Tween 20 in TBS
Milch-Blockpuffer	0,5 % (v/v) Tween 20; 4 % Milchpulver in TBS
Albumin-Blockpuffer	0,5 % (v/v) Tween 20; 1 % BSA in TBS
β -Coumarsäurelösung	90 mM β -Coumarsäure in DMSO
Luminollösung	250 mM Luminol in DMSO
ECL-Lösung 1	2,5 mM Luminollösung 0,4 mM β -Coumarsäurelösung 100 mM Tris pH 8,5
ECL-Lösung 2	0,03 % H ₂ O ₂ 100 mM Tris pH 8,5
Röntgenfilm	Super RX; Fuji

Durchführung:

Die Immundetektion diente zur Identifikation von Proteinen mit Hilfe spezifischer Antikörper. Die visuelle Detektion dieser Proteine auf Blotmembranen erfolgte durch Chemilumineszenz.

Nach erfolgtem Transfer der Proteine wurde die Oberfläche der Membran durch Inkubation in Milch-Blockpuffer für eine Stunde bei RT bzw. über Nacht bei 4°C abgesättigt. Einige Antikörper erforderten den Einsatz von Albumin-Blockpuffer zum blocken bzw. färben.

Der Primärantikörper wurde in entsprechendem Blockpuffer gemäß Angabe (s. 2.5) verdünnt. Die Inkubation der geblockten Membran mit dem Primärantikörper erfolgte je nach Bedarf für 2h bei RT oder über Nacht bei 4°C auf dem Schüttler. Die Primärantikörperverdünnung konnte je nach Antikörper bei 4°C oder -20°C gelagert und mehrfach verwendet werden.

Überschüssiger Primärantikörper wurde durch mehrmaliges (3-4) Waschen in TBS / Tween für 10 min bei RT entfernt. Der entsprechende Sekundärantikörper wurde in

Milch-Blockpuffer verdünnt, meist 1:5000 und mit der Membran für 1-2 Stunden bei RT auf dem Schüttler inkubiert. Danach wurde die Membran erneut mehrmals mit TBS / Tween für 10 min bei RT gewaschen. Zum Schluss wurde die Membran noch einmal für 5min in TBS gewaschen.

Für die ECL(*enhanced chemiluminescence*)-Reaktion wurden jeweils 10 ml von ECL-Lösung 1 bzw. 2 angesetzt, bei mehr als zwei Blotmembranen wurde die doppelte Menge angesetzt. Diese Lösungen wurden erst kurz vor dem Belichten des Röntgenfilms gemischt und mit der Membran für einige Sekunden inkubiert. Ab diesem Zeitpunkt wurde unter Rotlichtbedingungen gearbeitet. Die Blotmembran wurde dann in eine Filmkassette unter eine Klarsichtfolie gebracht und darauf ein Röntgenfilm gelegt. Das Belichten des Films dauerte je nach Intensität des Signals von 1 sec bis zu 30 min. Die Röntgenfilme wurden in einem X-Omat 2000 von Kodak entwickelt.

3.3.11 Entfernen von Antikörpern von einer Blotmembran

Material:

Ablösepuffer	50 mM Tris pH 6,8; 4 % SDS; 1 % (v/v) β -Mercaptoethanol
TBS	50 mM Tris pH 7,6; 150 mM NaCl
TBS / 1 % Tween	1 % (v/v) Tween 20 in TBS

Durchführung:

Um Blotmembranen die schon einer Immundetektion (s. 3.3.10) unterzogen wurden mit anderen Antikörpern zu inkubieren, mussten die zuvor verwendeten Primär- und Sekundärantikörper von der Membran entfernt werden.

Die Blotmembran wurde mit 10 ml Ablösepuffer im Wasserbad bei 65°C für 30 min behandelt. Bei erwartetem schwachem Signal des danach folgenden Antikörpers wurde das Ablösen der Antikörper bei RT durchgeführt. Die Membran wurde anschließend mit ausreichend Wasser gewaschen um das β -Mercaptoethanol zu entfernen und danach 4 - 5mal für 5 min in 10 ml TBS / 1 % Tween geschwenkt. Nach erneutem Blocken der Membran in entsprechendem Blockpuffer konnte eine weitere Immundetektion (s. 3.3.10) durchgeführt werden.

3.3.12 Präparation von GST-Fusionsproteinen aus Bakterien

Material:

LB-Medium	1 % (w/v) Trypton; 0,5 % (w/v) Hefeextrakt; 177 mM NaCl; pH 7,0
Glukoselösung	20 % (w/v)
Antibiotika	Ampicillin
IPTG-Lösung	1 M
Protease-Inhibitoren	Aprotinin; Leupeptin; PMSF; je 10 µg / µl
PBS	137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na ₂ HPO ₄ ; 2 mM NaH ₂ HPO ₄ ; pH 7,4
PBS / Triton	1 % (v/v) Triton X-100 in PBS
Elutionspuffer	50 mM Tris pH 8,0; 25 mM Glutathion; pH 8,0
Glutathion-Sepharose 4B; GE Healthcare	

Durchführung:

Diese Methode der Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen wurde hauptsächlich eingesetzt um Proteine als Enzymquelle bzw. als Substrat für Methylierungsreaktionen zu erhalten.

Das Plasmid mit dem zu exprimierenden GST-Fusionsprotein wurde in Bakterien (Stamm: BL21 DE3 s. 2.2) transformiert (s. 3.2.3) und damit eine 25 ml Übernachtskultur angeimpft. Mit dieser Kultur wurden dann 500 ml LB-Medium angeimpft, welche 2 % Glukose sowie das entsprechende Antibiotika enthielten. Diese Wachstumskultur wurde so angeimpft, damit diese eine optische Dichte (OD) von 0,1 besaß und bei 37°C im Bakterienrührer kultiviert. Die OD wurde alle 30 min gemessen und bei Erreichen einer OD von 0,6 wurde die Expression des GST-Fusionsproteins induziert, indem man IPTG in einer Endkonzentration von 1 mM hinzufügte. Bei der Expression einiger GST-Fusionsproteine wurde die Wachstumstemperatur auf 30°C gesenkt, um die Anreicherung des Proteins in *inclusion bodies* und somit dessen Unlöslichkeit zu reduzieren. Nach 3 Stunden erfolgte das Ernten der Bakterien durch Zentrifugation bei 5000 U/min für 20min. Das erhaltene Bakterienpellet wurde dann in 10 ml PBS / Triton und Protease-Inhibitoren (1:1000 Verdünnung) resuspendiert. Diese Bakteriensuspension sonifizierte man anschließend 4 - 6 Mal für 30 sec bei 20 % Leistung und kühlte dabei mit Eis. Die Zelltrümmer wurden dann bei 5500 U/min für 20 min bei 4°C abzentrifugiert und das erhaltene

Bakterienlysat abgenommen. Zum Isolieren des GST-Fusionsproteins wurde das Lysat mit 300 µl Glutathion-Sepharose für 2 h bei RT oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Sepharose wurde nun bei 1500 U/min für 5min bei 4°C pelletiert und insgesamt 4 Mal mit 20 ml PBS / Triton und einmal mit 20 ml PBS gewaschen. Die Sepharose samt gebundenem Fusionsprotein konnte nun nach Zugabe von 10 % Glycerin bei -20°C gelagert werden oder aber das Protein eluiert werden. Dazu wurde die Glutathion-Sepharose mit 300 µl Elutionspuffer für 30 min bei 4°C auf dem Rad inkubiert und anschließend für 1 min bei 6000 U/min zentrifugiert. Das erhaltene Eluat konnte dann nach Bedarf über Nacht gegen PBS / 10% Glycerol dialysiert werden, um freies Glutathion zu entfernen. Danach konnte das Dialysat bei -20°C bzw. -80°C gelagert werden.

3.3.13 Präparation von His-Fusionsproteinen aus Bakterien

Material:

LB-Medium	1 % (w/v) Trypton; 0,5 % (w/v) Hefeextrakt; 177 mM NaCl; pH 7,0
Glukoselösung	20 % (w/v)
Antibiotika	Ampicillin
IPTG-Lösung	1 M
Protease-Inhibitoren	Aprotinin; Leupeptin; PMSF; je 10 µg / µl
TBS	50 mM Tris pH 7,6; 150 mM NaCl
TBS / Triton	1 % (v/v) Triton X-100 in TBS
Elutionspuffer	500 mM Imidazol in TBS pH 8,0
Nickel-NTA-Agarose; Qiagen	

Durchführung:

Diese Aufreinigung von His-Fusionsproteinen aus Bakterien wurde ebenfalls eingesetzt um Proteine als Enzymquelle bzw. als Substrat für Methylierungsreaktionen zu erhalten.

Die Expression des His-Fusionsproteins in BL21 DE3 *E.coli* sowie die Aufzucht der Bakterien erfolgte entsprechend 3.3.12. Das erhaltene Bakterienpellet wurde dann in 10 ml TBS / Triton / 25 mM Imidazol und Protease-Inhibitoren (1:1000 Verdünnung) resuspendiert. Diese Bakteriensuspension wurde anschließend 4 - 6 Mal für 30 sec bei

Methoden

20 % Leistung sonifiziert und dabei mit Eis gekühlt. Die Zelltrümmer wurden dann bei 5500 U/min für 20 min bei 4°C abzentrifugiert und das erhaltene Bakterienlysats abgenommen. Zum Binden des His-Fusionsproteins wurde das Lysat mit 300 µl Nickel-NTA-Agarose für 2 h bei RT oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Agarose wurde nun bei 1500 U/min für 5min bei 4°C pelletiert und insgesamt 4 Mal mit 20 ml TBS / Triton und einmal mit 20 ml TBS gewaschen. Die Agarose samt gebundenem Fusionsprotein konnte nun nach Zugabe von 10 % Glycerin bei -20°C gelagert werden oder das Protein eluiert werden. Dazu wurde die Nickel-NTA-Agarose mit 300 µl Elutionspuffer für 30 min bei 4°C auf dem Rad inkubiert und anschließend für 1 min bei 6000 U/min zentrifugiert. Das erhaltene Eluat konnte dann nach Bedarf über Nacht gegen TBS / 10% Glycerol dialysiert werden, um freies Imidazol zu entfernen. Das Dialysat konnte dann bei -20°C bzw. -80°C gelagert werden.

3.3.14 Präparation von unlöslichen His-Fusionsproteinen aus Bakterien

Material:

LB-Medium	1 % (w/v) Trypton; 0,5 % (w/v) Hefeextrakt; 177 mM NaCl; pH 7,0
Glukoselösung	20 % (w/v)
Antibiotika	Ampicillin
IPTG-Lösung	1 M
Puffer A	6 M Guanidinhydrochlorid; 0,1 M NaH ₂ PO ₄ ; 0,01 M Tris; pH 8,0
Puffer B	8 M Harnstoff; 0,1 M NaH ₂ PO ₄ ; 0,01 M Tris; pH 8,0
Puffer C	8 M Harnstoff; 0,1 M NaH ₂ PO ₄ ; 0,01 M Tris; pH 6,3
Elutionspuffer	1 M Imidazol in Puffer B pH 8,0
Nickel-NTA-Agarose;	Qiagen

Durchführung:

Die Präparation von His-Fusionsproteinen aus Bakterien mittels dieser Methode wurde verwandt, um Proteine für die Generierung eines polyklonalen Antikörpers in Kaninchen zu erhalten. Die chaotropen Bedingungen erlaubten die Aufreinigung

größerer Mengen Fusionsprotein und reduzierten die Verunreinigung mit Fremdproteinen.

Die Expression des His-Fusionsproteins in BL21 DE3 *E.coli* sowie die Aufzucht der Bakterien erfolgte entsprechend 3.3.12. Das Pellet wurde dann in 10 ml Puffer A resuspendiert. Anschließend wurde die Suspension für 2 min mit einem Vortex vermischt, einmal für 30 sec bei 20 % Leistung sonifiziert und 30 min bei RT inkubiert. Nach erneutem Vortexmischen für 2 min wurde die Zellsuspension bei 5500 U/min für 20 min abzentrifugiert. Das Bakterienlysat wurde abgenommen und mit 400 µl Ni-NTA-Agarose versetzt. Die Bindung des His-Fusionsproteins an die Agarose erfolgte für 60 min bei RT auf dem Rad. Danach zentrifugierte man die Ni-Agarose bei 1500 U/min für 5 min ab und wusch diese 4 Mal mit 20 ml Puffer C. Es wurde noch einmal mit 20 ml Puffer B gewaschen und der Überstand abgenommen. Die Ni-Agarose wurde dann mit 400 µl Elutionspuffer versetzt und bei RT für 30 min auf dem Rad inkubiert, um das gebundene Fusionsprotein zu eluieren. Nach kurzem Zentrifugieren der Agarose für 1 min bei 6000 U/min wurde das Eluat abgenommen, worauf ein zweiter Elutionsschritt mit denselben Bedingungen erfolgte, um restliches Fusionsprotein abzulösen. Die Eluate wurden mit 10 % Glycerol versetzt und bei -20°C bzw. -80°C gelagert.

3.3.15 Herstellung von Gesamtzellextrakt aus eukaryotischen Zellen (IPH-Extrakt)

Material:

PBS	137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na ₂ HPO ₄ ; 2 mM NaH ₂ HPO ₄ ; pH 7,4
IPH-Puffer	50 mM Tris pH 8,0; 150 mM NaCl; 5 mM EDTA; 0,5 % IGEPAL
Protease-Inhibitoren	Aprotinin; Leupeptin; PMSF; je 10 µg / µl

Durchführung:

Diese Methode der Zellextraktion wurde zur Herstellung von Proteinextrakten für den Großteil der Experimente eingesetzt, wie beispielsweise Immunpräzipitation (s. 3.3.19), Peptid-Pulldowns (s. 3.3.26) etc.

Methoden

Die folgenden Angaben beziehen sich auf die Zellmenge einer konfluenten 145 mm Zellkulturschale. Die Schale mit den adhären Zellen wurde zweimal mit kaltem PBS gewaschen und die Zellen mit einem Gummiwischer in ca. 2 ml PBS abgeschabt. Die Zellsuspension wurde dann bei 1500 U/min für 5 min bei 4°C zentrifugiert und einmal mit PBS gewaschen. Nach erneutem Zentrifugieren bei 1500 U/min für 5 min bei 4°C wurden die Zellen in IPH-Puffer mit frisch dazugegebenen Protease-Inhibitoren (1:1000 Verdünnung) resuspendiert (abhängig von der Menge an Zellen ca. 300-600µl IPH-Puffer). Diese Suspension wurde anschließend bei 4°C für 20 min unter Rotation inkubiert. Nach erfolgter Extraktion zentrifugierte man die Zelltrümmer bei 13000 U/min für 15 min bei 4°C ab und erhielt im Überstand den Gesamtzellextrakt. Dem IPH-Extrakt wurden 10% Glycerol hinzugefügt und der Proteingehalt mittels der Bradford-Methode (s. 3.3.1) bestimmt. Danach konnte der Extrakt bei -20°C bzw. -80°C gelagert werden.

3.3.16 Herstellung von Gesamtzellextrakt aus eukaryotischen Zellen (IPH-Extrakt) mit Benzonase-Behandlung

Material:

s. 3.3.15

Magnesiumchlorid 1 M MgCl₂

Benzonase Nuclease HC; Novagen (250 U/µl)

Durchführung:

Sollte der IPH-Extrakt (s. 3.3.15) zum Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen verwendet werden, wurde eine Endonukleasebehandlung eingefügt. Dabei werden Chromatin sowie RNA verdaut um eventuelle Protein-Nukleinsäure-Interaktionen auszuschließen.

Die Herstellung des Extrakts erfolgte wie beschrieben. Nach der Extraktion wurde MgCl₂ hinzugefügt (Endkonzentration 1 mM) sowie 1 µl Benzonase pro ml Extrakt. Die Behandlung erfolgte für 2 Stunde bei 4°C unter Rotation. Die nachfolgende Vorgehensweise entsprach der von 3.3.15.

3.3.17 Herstellung von cytoplasmatischem Extrakt / Kernextrakt aus eukaryotischen Zellen

Material:

PBS	137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na ₂ HPO ₄ ; 2 mM NaH ₂ HPO ₄ ; pH 7,4
Puffer A1	10 mM HEPES pH 7,9; 10 mM KCl; 1,5 mM MgCl ₂ ; 0,5 mM DTT; 0,04 % IGEPAL
Puffer A2	10 mM HEPES pH 7,9; 10 mM KCl; 1,5 mM MgCl ₂ ; 0,5 mM DTT
Puffer B	20 mM HEPES pH 7,9; 400 mM NaCl; 1,5 mM MgCl ₂ ; 0,5 mM DTT; 0,2 mM EDTA; 0,5 % IGEPAL
Protease-Inhibitoren	Aprotinin; Leupeptin; PMSF; je 10 µg/µl

Durchführung:

Sollte für Experimente ausschließlich nukleärer Extrakt verwendet werden, wurde diese Extraktionsmethode angewandt.

Die folgenden Angaben beziehen sich auf die Zellmenge einer konfluenten 145 mm Zellkulturschale. Die Zellen auf der Kulturschale wurden zweimal mit kaltem PBS gewaschen und mit einem Gummiwischer in 3 ml PBS geerntet. Die Zellen wurden für 5 min bei 1500 U/min bei 4°C zentrifugiert und mit PBS gewaschen. Nach Abzentrifugieren des Überstands wurde das Zellpellet in 500 µl Puffer A1 mit Protease-Inhibitoren aufgenommen und resuspendiert. Anschließend erfolgte die Inkubation der Zellen für 5 min auf Eis. Die Zellkerne wurden dann bei 2000 U/min für 5 min bei 4°C abzentrifugiert. Der Überstand enthielt den cytoplasmatischen Extrakt. Das Zellkernpellet wurde in 500 µl Puffer A2 resuspendiert und sofort bei 2000 U/min und 4°C für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, das Pellet in 250 µl Puffer B mit Protease-Inhibitoren aufgenommen und bei 4°C unter Rotation für 20 min inkubiert. Die restlichen Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation bei 13000 U/min für 10 min bei 4°C abgetrennt und man erhielt im Überstand den Kernextrakt. Die Proteinkonzentrationen beider Extrakte wurden mittels Bradford-Bestimmung (s. 3.3.1) ermittelt und die Extrakte nach Zugabe von 10 % Glycerol bei -20/-80°C gelagert.

3.3.18 Aufreinigung von Strep-Tag Fusionsproteinen aus Gesamtzellextrakt

Material:

PBS	137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na ₂ HPO ₄ ; 2 mM NaH ₂ HPO ₄ ; pH 7,4
Bindungs-Puffer	50 mM Tris pH 8,0; 300 mM NaCl; 2 mM MgCl ₂ ; 1 mM EDTA; 0,1 % Triton; 0,5 % IGEPAL; 5 mM β -Mercaptoethanol
Wasch-Puffer	50 mM Tris pH 7,5; 300 mM KCl; 0,1 % Triton
Protease-Inhibitoren	Aprotinin; Leupeptin; PMSF; je 10 μ g/ μ l
Streptavidin-Sepharose; GE Healthcare	

Durchführung:

Fusionsproteine, die einen Strep-Tag enthalten, konnten mit dieser Methode aus Zellextrakten aufgereinigt werden. Als Proteinquelle dienten dazu stabile MCF-7 Zellklone, die Strep-getagte TAP-PRMT6 exprimierten (s. 2.1).

Die folgenden Angaben beziehen sich auf die Zellmenge von 10 konfluenten 145 mm Zellkulturschalen. Die Zellen auf der Kulturschale wurden zweimal mit kaltem PBS gewaschen und mit einem Gummiwischer in 2 ml PBS pro Schale geerntet. Die Zellen wurden für 5 min bei 1500 U/min bei 4°C zentrifugiert und einmal mit PBS gewaschen. Das Zellpellet wurde in 6 ml Bindungspuffer mit frisch dazugegebenen Protease-Inhibitoren aufgenommen und 20 min bei 4°C unter Rotation inkubiert. Danach wurde die Suspension mit 4 μ l Benzonase für 2 Stunden bei 4°C behandelt. Der Extrakt wurde bei 5500 U/min und 4°C für 20 min zentrifugiert und der Überstand in ein neues Gefäß überführt. Die Proteinkonzentration des Extrakts wurde bestimmt (s. 3.3.1) und 200 μ l Streptavidin-Sepharose pro 10 mg Extrakt zugegeben. Die Bindung des Fusionsproteins an die Sepharose erfolgte unter Rotation über Nacht bei 4°C. Danach wurde der Extrakt bei 1500 U/min für 5 min bei 4°C abzentrifugiert, der Überstand verworfen und die Sepharose 6 bis 8mal mit 10 ml Waschpuffer gewaschen. Das gebundene Fusionsprotein wurde dann sofort für nachfolgende Experimente eingesetzt.

3.3.19 Immunpräzipitation (IP)

Material:

PBS	137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na ₂ HPO ₄ ; 2 mM NaH ₂ HPO ₄ ; pH 7,4
IPH-Puffer	50 mM Tris pH 8,0; 150 mM NaCl; 5 mM EDTA; 0,5 % IGEPAL

Antikörper; spezifisch für das jeweilige Protein (s. 2.5)

Protein A und Protein G Sepharose; GE Healthcare

Durchführung:

Um ein spezielles Proteine spezifisch aus einem Extrakt zu isolieren, wurde eine Immunpräzipitation (IP) durchgeführt. Dabei wurde das erwünschte Protein von einem dafür spezifischen Antikörper gebunden und dann mittels Protein A bzw. G Sepharose präzipitiert.

Es wurde eine Gesamtzellextrakt nach 3.3.15 aus den gewünschten Zellen hergestellt. Für die Immunpräzipitation wurde je nach Bedarf Extrakt mit einem Proteingehalt von 200 µg bis 10 mg eingesetzt. Bei mehreren Experimenten wurden die Volumina der Proben mit IPH-Puffer ausgeglichen. Zum Zellextrakt wurde dann der entsprechende Antikörper (s. 2.5) gegeben, dabei variierte die Menge dessen von 1 bis zu 10 µg pro Experiment. Die Bindung des Antikörpers an das Zielprotein erfolgte unter Rotation bei 4°C über Nacht. Pro IP wurden 5 µl Protein A Sepharose und 5 µl Protein G Sepharose gemischt und zweimal mit IPH-Puffer gewaschen. Um den Antikörper samt Zielprotein zu binden, wurde die Protein A/G Sepharose-Mischung dann zum IP-Ansatz gegeben und unter Rotation bei 4°C für 2 Stunden inkubiert. Anschließend wurde die Sepharose bei 6000 U/min für 1 min abzentrifugiert, der Überstand verworfen und die Sepharose 4 – 6-mal mit IPH-Puffer gewaschen. Das Sepharose-Pellet wurde dann in SDS-Probenpuffer aufgenommen, auf ein Polyacrylamidgel geladen (s. 3.3.3) und mittels Immundetektion (s. 3.3.10) analysiert. Um die Effizienz der Präzipitation zu überprüfen, nahm man zusätzlich 1 – 10% der Menge des eingesetzten Extrakts und trug dies ebenfalls auf das Polyacrylamidgel auf.

Proteine erfolgte durch Fluorographie (s. 3.3.21) oder Szintillationsmessung (s. 3.3.22 bzw. 3.3.23).

3.3.21 Fluorographie

Material:

Intensifying Screen Biomax Transcreen LE; Kodak
Amersham Hyperfilm MP; GE Healthcare

Durchführung:

Die Fluorographie dient zur Visualisierung von radioaktiv markierten Proteinen. Diese radioaktive Markierung wurde durch eine Methyltransferasereaktion erreicht.

Nach erfolgter Methylierung (s. 3.3.20) des zu untersuchenden Proteins mit ^{14}C -SAM als Methylgruppendonor wurde die Reaktionsmischung einer SDS-Gelelektrophorese (s. 3.3.3) unterzogen und anschließend mittels Western-Blot (s. 3.3.7) auf eine PVDF-Membran transferiert. Diese Membran wurde getrocknet, in eine Filmkassette geklebt und auf ihr ein Intensifying Screen befestigt. In den Screen wurde dann bei völliger Dunkelheit der Röntgenfilm gelegt und für 1 bis 10 Tage exponiert. Der Film wurde dann in einem Kodak X-Omat 2000 entwickelt.

3.3.22 Szintillationsmessung von radioaktiv markierten Peptiden

Material:

Szintillationsverstärkerlösung Rotiszint Eco plus; Roth
Szintillationszähler

Durchführung:

Sollte die Methyltransferaseaktivität der zu untersuchenden Enzyme auf Histonpeptiden gemessen werden, so wurde die auf die Peptide übertragene Radioaktivität mittels eines Szintillationszählers quantifiziert.

Die Peptide wurden gemäß 3.3.20 mit ^3H -SAM als Methylgruppendonor methyliert, durch eine SDS-Gelelektrophorese (s. 3.3.3) aufgetrennt und auf eine Blotmembran transferiert (s. 3.3.7). Auf dieser Membran konnten die Peptide dann mittels Ponceau-Färbung (s. 3.3.9) sichtbar gemacht werden. Die Membranstücke mit den angefärbten

Methoden

Peptiden wurden ausgeschnitten und zusammen mit 2 ml Szintillationsverstärkerlösung in ein Szintillationsröhrchen gegeben. Die Radioaktivität der Peptide wurde in einem Szintillationszähler als Zerfallsrate des Tritiums in counts per minute (cpm) gemessen.

3.3.23 Szintillationsmessung von Edman-Sequenzanalysefraktionen

Material:

Acetonitril	50 % (v/v) Acetonitril
Szintillationsverstärkerlösung	Rotiszint Eco plus; Roth
Szintillationszähler	

Durchführung:

Mit Hilfe dieser Methode konnten Methylierungsstellen im N-terminalen Teil von Proteinen, beispielsweise Histone bis auf die Aminosäure genau identifiziert werden.

Dazu wurden die Proteine nach erfolgter Methylierung (s. 3.3.20), SDS-Gelelektrophorese (s. 3.3.3) und Westernblot (s. 3.3.7) durch Ponceau-Färbung (s. 3.3.9) sichtbar gemacht und ausgeschnitten. Die Membranstücke mit den Proteinen wurden zur Edman-Sequenzanalyse geschickt (s. 3.3.28). Nach erfolgter Edman-Degradation erhielt man die einzelnen Fraktionen, welche den Aminosäuren der N-terminalen Sequenz entsprachen. Die Fraktionen wurden in 200 µl 50% Acetonitril aufgenommen und in einem Szintillationsröhrchen mit 2 ml Szintillationsverstärkerlösung gut vermischt. Die Radioaktivität der Aminosäurefraktionen wurde in einem Szintillationszähler in counts per minute (cpm) gemessen, was der Zerfallsrate des ^3H entsprach.

3.3.24 Flüssig-Methyltransferase Test

Material:

Waschlösung	50 mM Na_2HPO_4 pH 9,0
Aceton p. a.	
P-81 Papier; Whatman	
Szintillationsverstärkerlösung; Roth	
Szintillationszähler	

Durchführung:

Diese Methode dient der zügigen Untersuchung der Methyltransferaseaktivität von Enzymen bezüglich Peptiden. Dabei kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, daß eventuelle Hintergrundradioaktivität, hervorgerufen beispielsweise durch Automethylierung der Enzyme, die Messergebnisse verfälscht.

Die Methylierungsreaktion wurde nach Vorschrift (s. 3.3.20) durchgeführt. Die Reaktionsmischung wurde allerdings nicht mit SDS-Probenpuffer versetzt, sondern direkt auf 1 x 1 cm große P-81 Papierstücke pipettiert. Nach Trocknen der Papiere an der Luft wurden diese dreimal für 5 min in ca. 100 ml Waschlösung geschwenkt. Anschließend wusch man die Papierstücke einmal kurz in ca. 100 ml Aceton und lies sie trocknen. Die Papiere wurden mit 2 ml Szintillationsverstärkerlösung in ein Szintillationsröhrchen gegeben und im Szintillationszähler auf ihre Radioaktivität (^3H -Zerfallsrate) vermessen.

3.3.25 Kopplung von Peptiden an Sulfolink-Gel**Material:**

Kopplungs-Puffer	50 mM Tris pH 8,5; 5 mM EDTA
Block-Puffer	50 mM L-Cystein in Kopplungspuffer
Salzlösung	1 M NaCl
Sulfolink Coupling Gel	(Bindungskapazität: 1 mg Peptid / ml Gel); Pierce
Peptide	(s. 2.4) mit Sulfhydrylgruppe (Cystein) 4 µg / µl

Durchführung:

Um Peptide im Pulldown (s. 3.3.26) einzusetzen mussten diese kovalent an Sulfolink Coupling Gel gebunden werden. Peptide, welche eine Sulfhydrylgruppe tragen beispielsweise durch ein C-terminales Cystein, konnten an das Sulfolink-Gel gebunden werden, da dieses reaktive Iodacetylgruppen besitzt. Die Kopplung verlief unter Abspaltung von Iodwasserstoff und ergab eine kovalente Bindung zwischen Peptid und Gel.

Die benötigte Menge Sulfolink-Gel (200 µl Suspension = 100 µl Gel) wurde dreimal mit 1 ml Kopplungspuffer gewaschen und in 1 ml Kopplungspuffer aufgenommen. Die entsprechende Menge Peptid (100 µg) wurde hinzugefügt und für 30 min bei RT unter Rotation inkubiert. Anschließend wurde die Suspension für eine Stunde bei RT stehen

gelassen. Die Gel wurde bei 6000 U/min für 1 min abzentrifugiert und 4-mal mit 1 ml Kopplungspuffer gewaschen. Um noch unbesetzte Iodacetylgruppen des Gels abzusättigen, gab man 1 ml Block-Puffer hinzu und inkubierte für 30 min bei RT unter Rotation und nochmals 45 min bei RT ohne Rotation. Danach erfolgte abzentrifugieren und 6 – 8maliges Waschen mit 1ml Salzlösung und 4maliges Waschen mit 1 ml H₂O_{bid}. Das Sulfolink-Gel konnte dann in 20 % Ethanol bei 4°C gelagert werden. Als Hintergrundkontrolle wurde Gel ohne Peptid nur mit Block-Puffer inkubiert.

3.3.26 Peptid-Pulldown

Material:

IPH-Puffer	50 mM Tris pH 8,0; 150 mM NaCl; 5 mM EDTA; 0,5 % IGEPAL
BSA	5 mg/ml Bovines Serumalbumin in IPH-Puffer

Durchführung:

Diese Methode diente zum Nachweis von Interaktionen zwischen Proteinen und speziellen Peptiden. Diese Peptide entsprachen dem N-terminus von Histon H3 und trugen an bestimmten Aminosäuren post-translationale Modifikationen (s. 2.4). Sie wurden nach 3.3.25 an Sulfolink Coupling Gel gekoppelt. Die immobilisierten Peptide inkubierte man dann mit diversen Zellextrakten oder Überexpressionsextrakten und analysierte darauf Proteine, welche an die Peptide gebunden haben.

Das Gel mit den Peptiden musste vor dem Experiment mit BSA abgesättigt werden um unspezifische Proteinbindung zu minimieren. Dazu wurden 20 µl des jeweiligen Gel mit gekoppeltem Peptid zweimal mit IPH-Puffer gewaschen und danach in 0,5 ml IPH-Puffer mit BSA (Endkonzentration 1 µg / µl) versetzt. Das Absättigen erfolgte bei 4°C unter Rotation für 1 h. Währenddessen wurde der Zellextrakt vorgereinigt. Die einzusetzende Menge Extrakt (100 – 500 µg) wurde in ein Gefäß mit 20 µl ungekoppeltem Säulenmaterial gegeben, d.h. Gel, welches keine Peptid trug. Diese Suspension wurde in 1 ml IPH-Puffer ebenfalls für 1 h bei 4°C unter Rotation inkubiert. Danach zentrifugierte man das BSA-gesättigte Gel mit den Peptiden ab und entfernte den Überstand. Der vorgereinigte Zellextrakt wurde auch zentrifugiert, abgenommen und zu dem BSA-gesättigten Gel gegeben. Es folgte das eigentliche Pulldown-

Experiment durch Inkubation des Extrakts mit dem Peptidgel bei 4°C unter Rotation für 15 min. Die Suspension wurde sofort bei 6000 U/min für 2 min zentrifugiert und das Gel 6 – 8mal mit 1 ml IPH-Puffer gewaschen. Anschließend wurde SDS-Probenpuffer hinzugefügt um die gebundene Protein vom Gel zu lösen. Diese wurden dann mittels Gelelektrophorese (s. 3.3.3) und Western Blot analysiert (s. 3.3.7).

3.3.27 Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP)

Material:

PBS	137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na ₂ HPO ₄ ; 2 mM NaH ₂ HPO ₄ ; pH 7,4
Formaldehyd	37 % (v/v)
Glycin	2,5 mM
TE-Puffer	10 mM Tris pH 8,0; 1mM EDTA
Lysis-Puffer 1	5 mM PIPES pH 8,0; 85 mM KCl; 0,5 % (v/v) IGEPAL; Protease-Inhibitoren
Lysis-Puffer 2	10 mM Tris pH 7,5; 150 mM NaCl; 1 % (v/v) IGEPAL; 1 % (w/v) Na-Deoxycholat; 0,1 % (w/v) SDS; 1 mM EDTA; Protease-Inhibitoren
BSA-Lösung	20 mg / ml in TE-Puffer
Lachs-DNA	4 – 6 mg / ml sonifizierte Lachs-DNA
Wasch-Puffer 1	20 mM Tris pH 8,1; 150 mM NaCl; 2 mM EDTA; 0,1 % (w/v) SDS; 1 % (v/v) Triton – X 100
Wasch-Puffer 2	20 mM Tris pH 8,1; 500 mM NaCl; 2 mM EDTA; 0,1 % (w/v) SDS; 1 % (v/v) Triton – X 100
Wasch-Puffer 3	10 mM Tris pH 8,1; 250 mM LiCl; 1 mM EDTA; 1 % (v/v) IGEPAL; 1 % (w/v) Na-Deoxycholat
Elutions-Puffer	100 mM Natriumhydrogencarbonat; 1 % (v/v) SDS
Reversions-Puffer	400 mM Tris pH 6,8; 2 M NaCl; 100 mM EDTA
RNase A	10 µg / µl
Proteinase K	20 µg / µl
IgG Kaninchen; Sigma	
Protein A / G Sepharose; GE Healthcare	

Methoden

Qiaquick PCR Purification Kit; Qiagen

Sonifikator

Durchführung:

Die Chromatin-Immunpräzipitation erlaubt es die Interaktion von bestimmten Proteinen mit einzelnen DNA-Abschnitten des Chromatins nachzuweisen. Dazu wurde die Chromatin-Protein-Struktur chemisch vernetzt und das untersuchte Protein, beispielsweise ein Transkriptionsfaktor mittels eines Antikörpers immunpräzipitiert. Nun kann die Anwesenheit eines copräzipitierten DNA-Fragments durch PCR-Amplifikation spezifisch nachgewiesen werden und somit auch die Interaktion zwischen Protein und diesem DNA-Fragment.

Präparation des Chromatins:

Die Chromatinstruktur der zu untersuchenden Zellen musste zuerst vernetzt werden, dazu wurde Formaldehyd in einer Endkonzentration von 1 % (v/v) zu den Zellen auf der Kulturschale gegeben und dies bei RT für 10 min inkubiert. Um die Vernetzungsreaktion zu unterbinden, gab man Glycin in einer Endkonzentration von 125 mM hinzu und inkubierte für 5 min bei RT. Die Zellen wurden zweimal mit kaltem PBS gewaschen, in 1 ml PBS pro Kulturschale (145 mm) geerntet und durch Zentrifugation bei 1500 U/min für 5 min bei 4°C pelletiert. Das Zellepellet wurde anschließend in Lysis-Puffer 1 resuspendiert (1 ml pro 3 145 mm Kulturschalen) und auf Eis für 20 min inkubiert. Nach Zentrifugation für 5 min bei 6000 U/min und 4°C wurde der Überstand verworfen und das Zellkernpellet in Lysis-Puffer 2 (1 ml pro 3 145 mm Kulturschalen) aufgenommen, worauf erneute Inkubation auf Eis für 10 min folgte. Nun musste die Chromatinstruktur durch Sonifizieren in kleine Fragmente (ca. 500-1000 bp) aufgebrochen werden. Das Zelllysate wurde hierzu in 1 ml Fraktionen aufgeteilt und unter Eiskühlung 80mal für 1 sec bei 20 % Leistung und 4 sec Pause sonifiziert.

Zum Überprüfen der Fragmentgröße des Chromatins wurden die Fraktionen wieder vereinigt und 100 µl davon abgenommen. Zu diesen 100 µl fügte man 2 µl RNase A und 1 µl Proteinase K hinzu und inkubierte diese Mischung für 3 h bei 55°C und weitere 3 h für 65°C. Auf ein 1 % Agarosegel (s. 3.2.4) wurden 10 µl des Chromatins aufgetragen. Die Länge der DNA-Fragmente lag zwischen 200 und 1000 bp. Anhand dieser Probe wurde die Nukleinsäurekonzentration des Chromatins bestimmt, um bei

mehreren Bedingungen die für die Immunpräzipitation einzusetzenden Mengen Chromatin anzugleichen.

Absättigen der Protein A / G Sepharose:

Pro Immunpräzipitation wurden 70 µl einer 1:1 Mischung aus Protein A und Protein G Sepharose benötigt. Die Sepharose wurde zweimal mit ca. 10 ml Lysis-Puffer 2 gewaschen und bei 1500 U/min für 5 min pelletiert. Anschließend fügte man BSA-Lösung (Endkonzentration 1 mg / ml) und Lachs-DNA (Endkonzentration 0,4 mg / ml) in 5 ml Lysis-Puffer 2 hinzu und inkubierte bei 4°C unter Rotation über Nacht. Die Sepharose wurde dann zweimal mit 10 ml Lysis-Puffer 2 gewaschen.

Von dieser BSA-gesättigten Sepharose wurden nun 20 µl pro IP abgenommen und mit einem unspezifischen Antikörper gekoppelt. Dazu mischte man die Sepharose mit 2 µg Kaninchen IgG pro IP in 1 ml Lysis-Puffer 2 und inkubierte dies für 1 h bei 4°C unter Rotation. Nach Zentrifugation bei 6000 U/min für 1 min folgte dreimaliges Waschen mit 1 ml Lysis-Puffer 2.

Vorreinigen des Chromatins:

Um den Hintergrund bei der Immunpräzipitation zu minimieren wurde das Chromatin mit 20 µl BSA-gesättigter Sepharose pro IP versetzt und für 2 Stunden bei 4°C unter Rotation inkubiert. Die Sepharose wurde bei 1500 U/min und 4°C für 5 min abzentrifugiert und verworfen, der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt. In einem zweiten Reinigungsschritt wurde das Chromatin mit 20 µl IgG-gekoppelter Sepharose pro IP erneut für 2 Stunden bei 4°C unter Rotation inkubiert. Anschließend wurde abzentrifugiert und der Überstand für die Immunpräzipitation eingesetzt.

Immunpräzipitation:

Das vorgereinigte Chromatin wurde gleichmäßig verteilt, es wurden ca. 300-400 µl pro IP eingesetzt. Schließlich entnahm man noch 1 % des Chromatins als „Input“. Zum Chromatin wurden dann die entsprechenden Antikörper in den angegebenen Mengen (s. 2.5) zupipettiert und die Ansätze bei 4°C über Nacht unter Rotation inkubiert.

Darauffolgend gab man zu den IPs je 30 µl der BSA-gesättigten Sepharose hinzu und inkubierte für 2 h unter Rotation bei 4°C.

Waschen:

Die Protein A/G Sepharose mit den präzipitierten Proteinen wurde bei 6000 U/min für 2 min abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Es folgte das Waschen der Sepharose mit je 1 ml der angegebenen Pufferlösung:

- 2 x Wasch-Puffer 1

Methoden

- 2 x Wasch-Puffer 2
- 4 x Wasch-Puffer 3
- 2 x TE-Puffer

Elution des Chromatins:

Um das Chromatin von der Sepharose zu lösen, wurde diese nach dem letzten Waschschrift in 250 µl Elutionspuffer aufgenommen, kurz mit dem Vortex gemischt und für 15 min bei RT unter Rotation inkubiert. Es wurde bei 6000 U/min für 1 min abzentrifugiert, der Überstand in ein anderes Gefäß gegeben und die Sepharose einer zweiten Elution mit denselben Bedingungen unterworfen. Der Überstand der zweiten Elution wurde mit dem Ersten vereinigt.

Aufspalten der Protein-DNA-Vernetzung:

Zu den Elutionsüberständen wurden je 50 µl Reversions-Puffer, 1 µl RNase A und 1 µl Proteinase K hinzugefügt. Diese Mischung wurde dann erst für 3 Stunden bei 55°C und anschließend über Nacht bei 65°C inkubiert.

Isolierung der DNA:

Die frei gewordene DNA wurde mittels eines DNA-Extraktionskits (Qiagen) nach Herstellerangaben isoliert und aufgereinigt. Die Elution von den Säulen erfolgte in 50 µl Qiagen EB-Puffer.

Analyse der immunpräzipitierten DNA:

Zur Quantifizierung der immunpräzipitierten DNA, wie auch der „Input“-DNA wurde die Quantitative – PCR (s. 3.2.8) eingesetzt.

3.3.28 Sequenzierung von Proteinen durch Edman-Abbau

Die Sequenzierung von Histon N-Termini durch den Edman-Abbau (s. 4.1.2.2) wurde von Dr. Emile Schiltz am Institut für Organische Chemie und Biochemie der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg durchgeführt.

3.3.29 Massenspektroskopische Analyse der Methylierung von Peptiden

Die Untersuchung der Arginin-Methylierung in Histonpeptiden (s. 4.1.3.2) mittels massenspektroskopischer Analyse fand in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Axel Imhof am Adolf-Butenandt-Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München statt.

3.3.30 Massenspektroskopische Identifikation von Proteinen

Die Identifizierung potentieller Bindungspartner von Histonpeptiden (s. 4.2.1.2) wurde von Dr. Eberhard Krause am Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie, Berlin durchgeführt.

3.4 Aufreinigung von Antikörpern

3.4.1 Generierung eines PRMT6-Antikörpers in Kaninchen

Material:

Freund's Adjuvant, komplett; Sigma-Aldrich

Freund's Adjuvant, inkomplett; Sigma-Aldrich

Durchführung:

Um spezifische Antikörper gegen PRMT6 zu generieren, wurde das Antigen als His-PRMT6 Fusionsprotein in Bakterien hergestellt. Dieses Fusionsprotein injizierte man Kaninchen und entnahm ihnen nach mehrmaliger Immunisierung das Blutserum, welches die erwünschten Antikörper enthielt.

Das als Antigen fungierende His-Fusionsprotein wurde nach 3.3.14 aus Bakterien isoliert. Die Konzentration des Proteins wurde mittels Vergleich mit BSA-Standards in der Coomassie-Färbung (s. 3.3.4) ermittelt. Für eine Immunisierung eines Kaninchens benötigte man 100 µg des Fusionsproteins, dabei sollte das Volumen der Proteinlösung 200 µl nicht überschreiten. Die Proteinlösung wurde falls nötig mit entsprechendem Puffer (s. 3.3.14) auf 200 µl aufgefüllt. Vor der Erstimmunisierung wurden dem Kaninchen mindestens 10 ml Präimmunserum abgenommen. Zur Erstimmunisierung wurden 200 µl der Antigenproteinlösung mit 400 µl komplettem Freund's Adjuvant zu einer homogenen Emulsion gemischt und dem Kaninchen injiziert. Zur weiteren Immunisierungen wurden dem Tier dann nach 2 Wochen 200 µl der Antigenproteinlösung mit 400 µl inkomplettem Freund's Adjuvant gespritzt. Dies wurde dann alle 3 Wochen wiederholt. Nach jeweils 3 Immunisierungen wurden dem Kaninchen 10 Tage nach der letzten Injektion ca. 5 ml Blut abgenommen und das Rohserum auf Immundetektion (s. 3.3.10) des Antigenproteins getestet. Bei

Methoden

zufriedenstellender Antikörperqualität wurde dem Kaninchen das komplette Blut entnommen. Zur Aufbereitung des Serums wurde das Blut 1 – 2 Stunden bei RT ruhend inkubiert, um die Bildung des Blutkuchens zu ermöglichen und dann bei 5500 U/min für 30 min zentrifugiert. Der Überstand enthielt das gewünschte Antikörperserum, das nach 3.4.2 oder 3.4.4 aufgereinigt werden konnte.

3.4.2 Affinitätsaufreinigung von Antikörpern mittels Membran-gebundenem Antigen

Material:

TBS	50 mM Tris pH 7,6; 150 mM NaCl
TBS / Tween	0,1 % (v/v) Tween in TBS
BSA-Lösung	3 % (w/v) BSA in TBS
Elutionspuffer	50 mM Glycin; pH 2,5 mit Salzsäure

Durchführung:

Bei dieser Methode der Antikörperaufreinigung wurde das Antigen auf Blotmembranen transferiert und diese mit dem Antikörperserum inkubiert. Die spezifisch an das Antigen gebundenen Antikörper konnten dann von der Membran eluiert werden.

Das Antigenprotein wurde nach 3.3.12 hergestellt und aufgereinigt. Davon wurden insgesamt 1 mg auf ein Polyacrylamidgel (s. 3.3.3) geladen und mittels Westernblot (s. 3.3.7) auf Nitrocellulosemembran transferiert. Das Antigenprotein wurde durch Ponceau-Färbung (s. 3.3.9) sichtbar gemacht und die Membranstücke, die das Antigen enthielten, ausgeschnitten. Um schwach gebundene Proteine von der Membran zu lösen, inkubierte man die Membran bei RT für 5 min mit Elutionspuffer und wusch danach zweimal für 2 min mit TBS. Anschließend wurde die Membran mit BSA-Lösung für 2 h bei RT abgesättigt. Das Antikörperserum wurde 1:5 in TBS verdünnt und bei 4°C über Nacht mit der Membran inkubiert. Die Serumverdünnung wurde abgenommen und für einen zweiten Aufreinigungsschritt aufbewahrt. Die Membran wurde 3-mal für 5 min bei RT mit TBS / Tween und zweimal mit PBS gewaschen. Zur Elution des Antikörpers wurde die Membran zweimal für 5 min bei RT mit Elutionspuffer inkubiert. Dem abgenommenen Eluat wurde sofort 1M Tris pH 9,5 hinzugefügt, um dieses zu neutralisieren, worauf beide Eluate vereint wurden. Den Antikörpereluaten gab man außerdem noch 10% (v/v) Glycerol und 0,02% (w/v) Natriumazid hinzu bevor

sie bei -80°C gelagert wurden. Mit vorher abgenommenen Aliquots der Eluate wurde die Immundetektion- (s. 3.3.10) bzw. Immunpräzipitationseffizienz (s. 3.3.19) des Antikörpers bestimmt. Mit der schon verwendeten Serumverdünnung wurde eine weitere Aufreinigung nach demselben Schema durchgeführt. Die Membranen mit dem Antigen konnten in PBS bei 4°C gelagert werden und weitere Male verwendet werden.

3.4.3 Herstellung einer Antigen-gekoppelten GST-Säule

Material:

LB-Medium	1 % (w/v) Trypton; 0,5 % (w/v) Hefeextrakt; 177 mM NaCl; pH 7,0
Glukoselösung	20 % (w/v)
Antibiotika	
Protease-Inhibitoren	Aprotinin; Leupeptin; PMSF
PBS	137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na_2HPO_4 ; 2 mM NaH_2HPO_4 ; pH 7,4; 5 mM DTT
PBS / DTT	5 mM DTT in PBS
PBS / Triton / DTT	1 % (v/v) Triton X-100; 5mM DTT in PBS
TBS	50 mM Tris pH 7,6; 150 mM NaCl
Elutionspuffer	50 mM Glycin; pH 2,5 mit Salzsäure
Kopplungsreagenz	50 mg BS^3 (bis[sulfosuccinimidyl]suberate); Pierce in 10 ml PBS (8,7 mM)
Säule	1 ml GSTrap; GE Healthcare

Durchführung:

Zur Antikörperaufreinigung über eine GST-Säule, musste diese erst mit dem entsprechenden GST-Fusionsprotein, welches als Antigen fungierte beladen werden. Das gebundene Antigenprotein wurde dann durch eine chemische Kopplung kovalent an das Säulenmaterial gebunden. Als Kopplungsreagenz wurde ein wasserlösliches Succinimidylsuberat verwendet, das primäre Aminogruppen miteinander verbindet.

Um eine 1 ml GSTrap-Säule mit GST-Fusionsprotein zu beladen, wurden 5 Präparationen dieses Proteins nach 3.3.12 benötigt. Die Expression des GST-PRMT6 Fusionsproteins in BL21 DE3 *E.coli* sowie die Aufzucht der Bakterien erfolgte entsprechend 3.3.12. Die Bakterienpellets wurden pro Präparation in 10 ml PBS /

Methoden

Triton / DTT mit Proteaseinhibitoren resuspendiert. Die Suspensionen wurden 4-mal für 30 sec bei 15% Leistung sonifiziert und das Lysat durch Zentrifugation bei 5500 U/min und 4°C für 20 min von Zelltrümmern getrennt. Die 5 Bakterienlysate (50ml) wurden vereinigt und mit 1 Volumenteil PBS / DTT verdünnt. Die GSTrap-Säule equilibrierte man zuvor mit 20 ml PBS / DTT bei einer Flussrate von 1ml / min und belud diese dann bei 0,4 ml / min mit der Lysatverdünnung. Anschließend wurde die Säule mit 30 ml PBS / Triton / DTT bei 1 ml / min gewaschen.

Es folgte die kovalente Kopplung des Proteins an die Säule. Ausgehend von einer Bindungskapazität der Säule von 10 mg pro ml Säulenmaterial erhält man eine maximale Proteinkonzentration (bei 70 kDa) von 140 µM. Die Konzentration des Kopplungsreagenz betrug 8,7 mM, was einem 62 fachen molaren Überschuss entsprach. Das Kopplungsreagenz wurde bei einer Flussrate von 0,1 ml / min über die Säule geschickt. Im nächsten Schritt wurde mit 10 ml PBS und 10 ml TBS bei 0,5 ml / min gewaschen. Das TBS diente außerdem dazu die Kopplungsreaktion abubrechen. Um die Kopplungseffizienz zu überprüfen, pumpte man 4 ml Elutionspuffer über die Säule, sammelte diesen in 400 µl Fraktionen und testete diese mittels Immundetektion (s. 3.3.10) auf Anwesenheit des GST-Fusionsprotein. Bei erfolgreicher Kopplung sollte kein oder nur sehr wenig Fusionsprotein durch den Elutionspuffer abgelöst werden. Nach erneutem Waschen mit 10 ml TBS (1 ml / min) wurde die Antigen-gekoppelte Säule mit 20 % (v/v) Ethanol bei 4°C gelagert.

3.4.4 Affinitätsaufreinigung von Antikörpern mittels Antigen-gekoppelter Säule

Material:

TBS	50 mM Tris pH 7,6; 150 mM NaCl
TBS / Tween	0,1 % (v/v) Tween in TBS
Elutions-Puffer	50 mM Glycin; pH 2,5 mit Salzsäure
Antigen-gekoppelte GST-Säule; GE Healthcare	

Durchführung:

Die Antigen-gekoppelte Säule wurde mit 10 ml TBS bei 1 ml / min equilibriert. Zeitgleich wurden 0,5 ml des Antikörperserums mit 2 ml TBS verdünnt. Diese Antikörperversdünnung wurde dann bei einer Flussrate von 0,05 ml / min über die Säule

gepumpt und der Durchfluss zwecks einer zweiten Aufreinigung aufgefangen. Die Säule wurde mit 20 ml TBS / Tween und anschließend mit 10 ml TBS bei 1 ml / min gewaschen. Die gebundenen Antikörper wurden mit insgesamt 5 ml Elutions-Puffer bei einer Flussrate von 0,5 ml / min eluiert, wobei man nach jedem Milliliter den Fluss für 2 min anhielt um die Inkubationsdauer zu erhöhen. Das Eluat wurde in 200 µl Fraktionen in Gefäßen aufgefangen, welche 13 µl 1 M Tris pH 9,5 enthielten, um das Eluat sofort zu neutralisieren. Nach der Elution spülte man die Säule mit 10 ml TBS / Tween und 10 ml TBS bei 1 ml /min. Es folgte eine zweite Aufreinigung mit der zuvor aufgefangenen Antikörperverschüttung. Die Elutionsfraktionen aus beiden Aufreinigungen wurden mittels Immundetektion (s. 3.3.10) mit anti-Kaninchen Sekundärantikörper (s. 2.5) auf die Anwesenheit von Immunoglobulinen getestet. Die am stärksten konzentrierten Fraktionen wurden vereinigt und auf ihre Immundetektion- (s. 3.3.10) bzw. Immunpräzipitationseffizienz (s. 3.3.19) hin überprüft.

4 Ergebnisse

4.1 Die Histon-Methyltransferase PRMT6

PRMTs sind bekannt dafür verschiedene Substrate zu methylieren. Von den PRMTs 1, 4, 5, 7, 8 und 9 weiß man, dass diese auch Histone methylieren können. Die Arginin-Methylierung von Histon N-Termini im Zusammenhang des „Histon-Codes“ (s. 1.2) übt dabei einen Effekt auf die Regulation von Chromatinprozessen aus. Für PRMT6 wurde bis dato noch keine Histonmethylierungsaktivität nachgewiesen. Da dieses Enzym allerdings hauptsächlich im Zellkern vorkommt und dort Chromatin-assoziierte Proteine methylieren kann (s. 1.1.5), stellte sich die Frage, ob PRMT6 ebenfalls zu den Histonmethyltransferasen gehört. Es sollte deshalb untersucht werden, ob die Argininmethyltransferase PRMT6 Methylgruppen auf die N-Termini von Histonen überträgt. Falls ja, sollte diese Aktivität bezüglich Spezifität, Katalysemechanismus sowie der Beeinflussung durch andere Histonmodifikationen hin charakterisiert werden.

4.1.1 Untersuchung der *in vitro* Histon-Methyltransferaseaktivität von PRMT6

Zunächst sollte generell überprüft werden, ob PRMT6 *in vitro* Methyltransferaseaktivität auf Histone zeigt. Zum Vergleich der Aktivität wurden zwei PRMTs benutzt, welche schon dafür bekannt sind als Histonmethyltransferasen zu agieren, PRMT1 und PRMT4. Als Enzymquelle für die Experimente wurden hierfür bakteriell aufgereinigte GST-Fusionsproteine benutzt.

4.1.1.1 Vergleich der Methyltransferaseaktivität von GST-PRMT1, GST-PRMT4 und GST-PRMT6

Die einzelnen Proteinargininmethyltransferasen PRMT 1, 4 und 6 wurden als GST-Fusionsproteine in *E.coli* Bakterien vom Stamm BL21 DE3 transformiert (s. 3.2.3) und aus diesen nach 3.3.12 als Überexpressionsproteine aufgereinigt. In **Abbildung 4.1** ist die Coomassiefärbung eines Polyacrylamidgels mit den einzelnen GST-PRMTs zu sehen. Dazu wurde die zur Aufreinigung benutzte Glutathion-Sepharose mit gebundenem GST-Protein vor Elution (Sv; Spur 2,5,8), das Eluat (E; Spur 1,4,7) und

die Sepharose nach Elution (Sn; Spur 3,6,9) aufgetragen. Dabei entsprach die jeweils oberste Proteinbande dem „volle Länge“-Protein. GST-PRMT1 und GST-PRMT6 liefen bei ca. 70 kDa, GST-PRMT4 bei ungefähr 100 kDa. Die restlichen Banden sind Degradationsprodukte der Fusionsproteine, die aufgrund des GST-Tags mit aufgereinigt wurden.

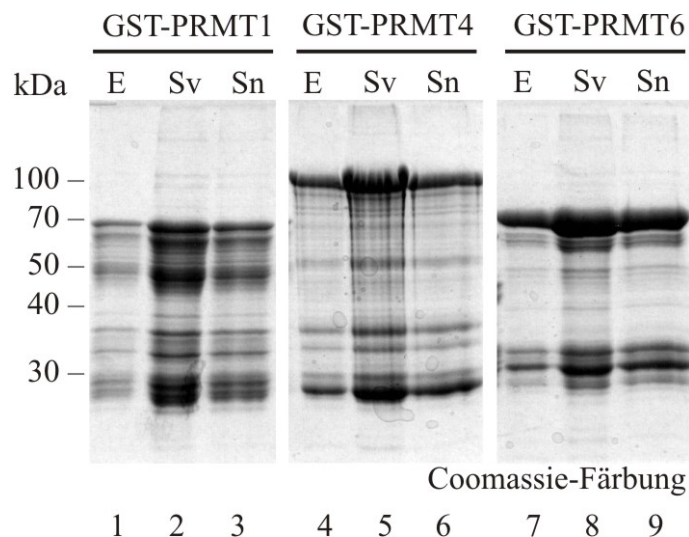


Abbildung 4.1: Darstellung der für die Methylierungsreaktion eingesetzten GST-PRMTs

Coomassiefärbung der GST-Fusionsproteine. Die GST-Fusionsproteine wurden nach 3.3.12 aufgereinigt. Von GST-PRMT1 bzw. GST-PRMT6 wurden je 10 µl Eluat / Sepharose aufgetragen, von GST-PRMT4 wurden 20 µl Eluat / Sepharose auf ein 10 %iges Polyacrylamidgel aufgetragen. Nach erfolgter Gelelektrophorese (s. 3.3.3) wurde das Gel mittels Coomassie angefärbt (s. 3.3.4). E: Eluat; Sv; Glutathion-Sepharose vor Elution; Sn: Glutathion-Sepharose nach Elution.

Mit den Eluaten dieser GST-Proteinargininmethyltransferasen wurden anschließend *in vitro* Methyltransferase-Reaktionen (s. 3.3.20) durchgeführt, um die Aktivität dieser Enzyme zu überprüfen. Dazu wurden als Substrate sowohl eine Mischung der Kernhistone H3, H2B, H2A und H4 aus Kalbsthymus eingesetzt, wie auch GST-GAR. Dieses ist ein Fusionsprotein aus GST und der Glycin-Arginin-reichen Sequenz aus Fibrillarin, welches von einigen PRMTs sehr gut methyliert wird. Da PRMT4 keine Aktivität auf GAR zeigt, wurde dessen Aktivität ausschließlich anhand von Histonen getestet. Um die Methylierung dieser Proteine nachweisen zu können, setzte man als Methylgruppendonator S-Adenosyl-L-[methyl- ^{14}C]-methionin (^{14}C -SAM) ein. Die zu übertragenden Methylgruppe des ^{14}C -SAM ist durch das Kohlenstoffisotop ^{14}C radioaktiv markiert, wodurch bei erfolgter Methyltransferase-Reaktion das methylierte Protein radioaktiv markiert wird. Die Substrate wurden mit den GST-PRMTs und ^{14}C -

SAM inkubiert (s. 3.3.20). Die Reaktion wurde dann durch Zugabe von SDS-Probenpuffer unterbrochen und einer Polyacrylamid-Gelelektrophorese (s. 3.3.3) unterzogen. Nach dem Transfer der Proteine durch Western-Blot (s. 3.3.7) konnten die methylierten und nun radioaktiv markierten Proteine mittels Fluorographie (s. 3.3.21) sichtbar gemacht werden. Dabei wurde der Radioaktivfilm über Nacht exponiert.

Das Ergebnis dieser Fluorographie der Methylierungsreaktion zeigt **Abbildung 4.2**. Sowohl PRMT1 als auch PRMT6 methylierten die GAR-Sequenz aus Fibrillarin. PRMT4 und PRMT1 zeigten die erwartete Aktivität auf Histonen. Dabei methylierte PRMT1 ausschließlich Histon H4 (Spur 2), während PRMT4 Histon H3 methylierte (Spur 3). Die schwachen Banden, die in der Fluorographie noch zu sehen sind, rühren von Abbauprodukten der Histone. Interessanterweise war PRMT6 in der Lage, neben GAR auch Histone zu methylieren (Spur 5). Im Vergleich mit PRMT1 und PRMT4 konnte man darauf schließen, dass zu mindestens die Histone H3 und H4 von PRMT6 methyliert werden konnten.

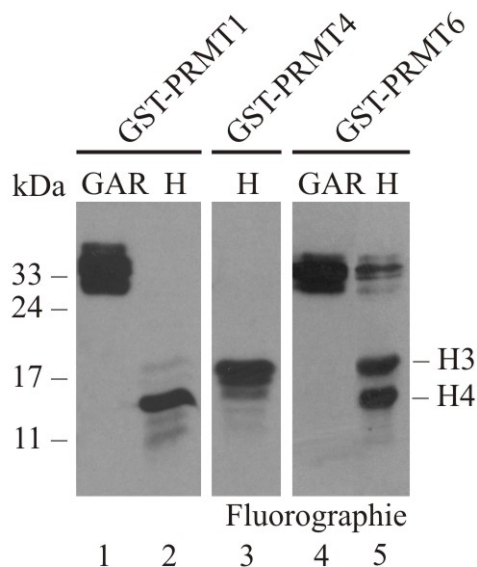


Abbildung 4.2: PRMT6 methyliert wie PRMT1 und PRMT4 Histone *in vitro*

Fluorographie einer Methyltransferasereaktion. Je 10 µl eluiertes GST-PRMT1 und GST-PRMT6, bzw. 20µl eluiertes GST-PRMT4 (s. 3.3.12) wurden für die Methyltransferase-Reaktion (s. 3.3.20) eingesetzt. Als Substrate wurden 1 µl eluiertes GST-GAR bzw. 1 µl Kern-Histone (20µg) und je 1µl S-Adenosyl-L-[methyl- ¹⁴C]-methionin als Methylgruppendonor verwendet. Die Methylierungsreaktion wurde für 2 h bei 30°C inkubiert, die Reaktionsmischung mittels Gelelektrophorese (17,5%) aufgetrennt, per Western-Blot auf eine PVDF-Membran transferiert und für 24 h einer Fluorographie (s. 3.3.21) unterzogen. GAR: GST-GAR; H: Kern-Histone.

4.1.1.2 Identifikation der von PRMT6 methylierten Histone

Um genauer zu untersuchen, welche der Kern-Histone als Substrate von PRMT6 dienen, wurden weitere Methylierungen mit GST-PRMT6 durchgeführt. Als Enzymquelle nutzte man wiederum eluiertes GST-PRMT6 wie schon zuvor. Als Testsubstrate wurden neben der Mischung aus Kalbsthymus-Kernhistonen auch die einzelnen Histone H3, H2B, H2A und H4 eingesetzt. Desweiteren sollten auch rekombinante Histone auf ihre Substrateigenschaften getestet werden, da diese im Gegensatz zu Kalbsthymushistonen keine posttranslationalen Modifikationen tragen. Somit konnte eine generelle Beeinflussung der PRMT6-Aktivität durch bereits vorliegende Histonmarkierungen untersucht werden. Dafür wurden allerdings nur Histon H3 und H4 verwendet. Zusammen mit dem radioaktiven Methylgruppendonor ^{14}C -SAM wurden die Substrate der Methylierung unterzogen. Die Histone wurden dann mittels Gelelektrophorese aufgetrennt, auf PVDF-Membran transferiert und durch Fluorographie visualisiert. Diese ist in **Abbildung 4.3** zu sehen.

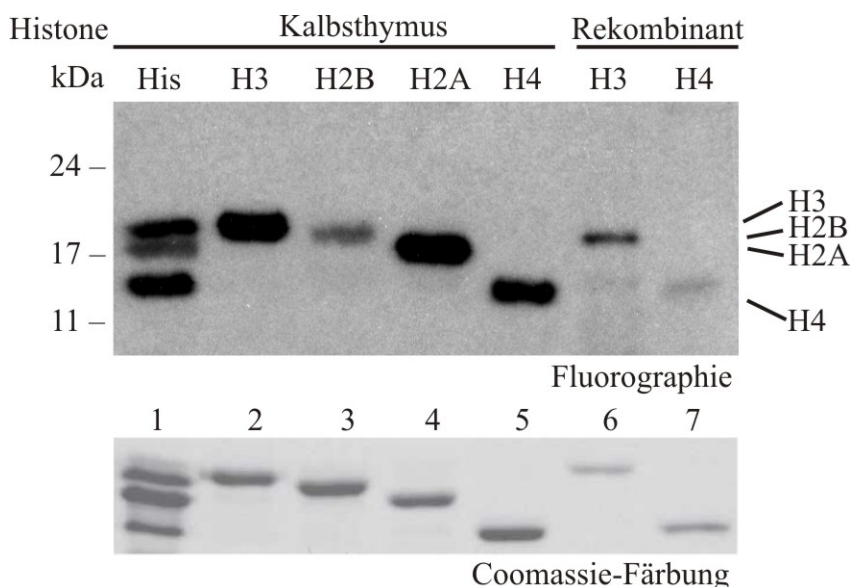


Abbildung 4.3: PRMT6 methyliert *in vitro* die Histone H3, H2A und H2B

Oben: Fluorographie der Methyltransferasereaktion mit PRMT6. 20 µg Kernhistone (Spur 1), 5 µg Histon H3 (Spur 2), H2B (Spur 3), H2A (Spur 4), H4 (Spur 5) aufgereinigt aus Kalbsthymus und 2,5 µg rekombinante *Drosophila* Histone H3 (Spur 6) und H4 (Spur 7) wurden mit 10 µl eluiertem GST-PRMT6 und 1 µl ^{14}C -SAM für 2 h bei 30°C der Methyltransferase-Reaktion (s. 3.3.20) unterzogen. Nach Auftrennung der Reaktionsmischung durch Gelelektrophorese (17,5%) (s. 3.3.3) und Westernblot-Transfer auf PVDF-Membran (s. 3.3.7) wurde diese über Nacht in der Fluorographie exponiert (s. 3.3.21). Unten: Coomassie-Färbung. Kontrollgel (17,5%) der eingesetzten Substrat-Histone. Die Mengen entsprechen den Angaben oben.

Zusätzlich zu der Fluorographie wurden die Mengen der eingesetzten Histone durch Coomassie-Färbung eines Kontrollgels gegeneinander abgeglichen. In Spur 1 ist wieder zu sehen, dass PRMT6 sowohl Histon H3 als auch H4 methylierte, zwischen diesen ist noch eine weitere Bande, allerdings schwächer zu sehen, welche H2A oder H2B entspricht. Bei der Methylierung der einzelnen Histone wird erst deutlich, welche Histone genau methyliert wurden. Spur 2 und 5 zeigten deutlich die Methylierung von Histon H3 und H4. Desweiteren war in Spur 4 zu sehen, dass Histon H2A ebenfalls als Substrat von PRMT6 diente. In Spur 3 war für Histon H2B zwar auch ein Signal zu erkennen, dieses ist aber im Vergleich zu denen von H3, H4 und H2A sehr schwach. Letztlich zeigen Spur 6 und 7, dass auch die rekombinanten Histone H3 und H4 Substrate von PRMT6 waren. Die schwächere Signalstärke dieser Histone rührt von der geringeren Menge an eingesetztem Histon her, wie in der Kontroll-Coomassiefärbung zu sehen ist.

PRMT6 methyliert also die Histone H3, H2A und H4 *in vitro*. Außerdem ist PRMT6 in der Lage auch rekombinante Histone, welche aus Bakterien aufgereinigt wurden als Substrate zu nutzen, was darauf hinweist, dass bereits vorliegende Histonmodifikationen keine Voraussetzung für eine Methylierung durch PRMT6 sind.

4.1.1.3 Untersuchung der PRMT6-Methyltransferaseaktivität auf Nukleosomen

Die bisher verwendeten Histonsubstrate waren alle isoliert vorliegende ungebundene Proteine. Da Histone im Chromatin aber nie frei vorkommen, sondern als von der DNA-Doppelhelix umschlossene Oktamere, den Nukleosomen, vorliegen (s. 1.2.1), sollte untersucht werden, ob diese von PRMT6 methyliert werden können.

Dazu wurden Histone von Magdalena Murawska, AG Prof. Brehm nach (Brehm et al. 2000) aus *Drosophila* Embryonen aufgereinigt und mit kurzen DNA-Fragmenten in Nukleosomen assembliert. Die Nukleosomen wurden dann als Substrate für die Methylierungsreaktion mit GST-PRMT6 eingesetzt. Desweiteren wurde das zur Assemblierung verwendete Histonoktamer und die Histone H3 und H4 aus Kalbsthymus als Positivkontrolle eingesetzt. Der Methylgruppendonor war wiederum ¹⁴C-SAM. Nach Gelelektrophorese und Western-Blot wurde eine Fluorographie durchgeführt, welche in **Abbildung 4.4** zu sehen ist.

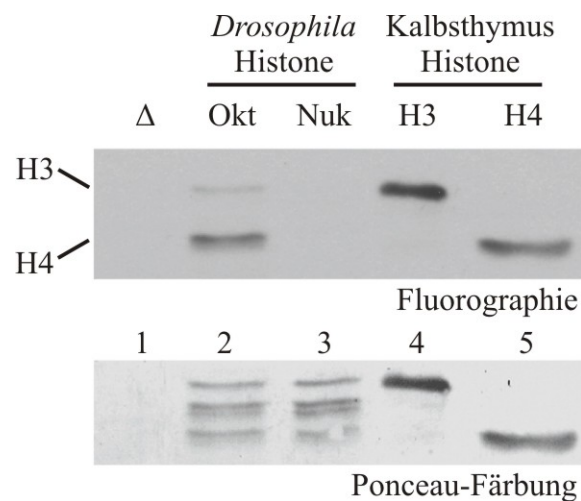


Abbildung 4.4: *in vitro* methyliert PRMT6 nicht Nukleosomen

Oben: Fluorographie der Methylierung von Nukleosomen. 1 μ g Histonoktamere (Spur 2) und 1 μ g Nukleosomen (Spur 3) aus *Drosophila* Embryonen sowie 0,5 μ g Histone H3 (Spur 4) und H4 (Spur 5) aus Kalbsthymus wurden mit 2 μ l aufgereinigter GST-PRMT6 und 1 μ l 14 C-SAM für 2h bei 30°C in der Methyltransferase-Reaktion (s. 3.3.20) eingesetzt. Die Substrate wurden durch Gelelektrophorese (17,5%) aufgetrennt (s. 3.3.3), auf PVDF-Membran transferiert (s. 3.3.7) und für 3 Tage in der Fluorographie exponiert (s. 3.3.21). Δ : GST-PRMT6 Automethylierung; Okt: *Drosophila* Histone; Nuk: *Drosophila* Nukleosom

Unten: Ponceau-Färbung der oben exponierten PVDF-Membran.

Da die Menge an eingesetzter aufgereinigtem GST-PRMT6 bei diesem Experiment geringer war als in Abbildung 4.3 (2 μ l Dialysat im Vergleich zu 10 μ l), wurde die Fluorographie hier für 3 Tage durchgeführt. Ein weiterer Grund hierfür war ein erwartetes schwaches Signal der eventuell methylierten Nukleosomen. In Spur 1 wurde GST-PRMT6 aufgetragen, um eine mögliche Automethylierung als Hintergrundsignale auszuschließen, welche hierbei nicht auftrat. Spur 2 zeigt die Methylierung des *Drosophila* Histone durch PRMT6. Zu erkennen sind lediglich Histone H3 und H4, die methyliert werden konnten, wobei H3 ein schwächeres Signal lieferte. In Spur 3 wurden die Nukleosomen aufgetragen. Hierbei zeigte sich, dass keine methylierten Histone zu detektieren waren. Die Signale der Positivkontrollen Histone H3 und H4 aus Säugern sind in Spur 4 bzw. 5 zu erkennen. Die Ponceaufärbung der exponierten Membran lässt die Menge der angegebenen Substrate erkennen.

PRMT6 ist also durchaus fähig die Histone, welche für die Nukleosomassemblierung eingesetzt wurden, *in vitro* zu methylieren (Spur 2). Liegen die Histone aber im Nukleosom gebunden vor, können sie *in vitro* nicht mehr von PRMT6 als Substrate verwendet werden (Spur 3).

4.1.2 Identifikation der PRMT6 - Methylierungsstellen in Histonen

Da nun bekannt war, dass PRMT6 wie andere Protein Arginin Methyltransferasen auch Histone methylieren kann, stellte sich die Frage nach den exakten Methylierungsstellen. Es sollte also das oder die Arginine bestimmt werden, auf welche die Methylgruppe durch PRMT6 übertragen wird.

4.1.2.1 Eingrenzung des von PRMT6 methylierten Bereichs in Histonen

Als erste Frage ergab, sich in welchem Bereich der Histone die von PRMT6 katalysierte Methylierung stattfindet. Strukturell bestehen Histone aus einer globulären Domäne sowie einem N-Terminus, der keinerlei Sekundärstruktur besitzt und aus dem globulären Bereich herausragt (s. 1.2.1). Bei den Histonen H2A und H4 liegt der C-terminus ebenfalls in dieser Form vor. Der N-Terminus der Histone ist häufig das Ziel von post-translationalen Modifikationen durch PRMTs. Daher sollte untersucht werden, ob auch PRMT6 seine Methylierung in diesem Bereich durchführt.

Zu diesem Zweck wurden Deletionskonstrukte der *Drosophila* Histone H3 und H4 (s. 2.8) auf ihre Substrateigenschaften überprüft. Diesen wurde durch Mutation der N-Terminus entfernt. Somit bestanden diese trunkierten Histone nur aus der globulären Domäne und dem C-Terminus. Als Positivkontrolle wurden die entsprechenden Wildtyp-Histone verwendet. Diese und die Deletionskonstrukte wurden zusammen mit den restlichen Kernhistonen als Histonoktamer einer Methyltransferase-Reaktion durch PRMT6 mit ^{14}C -SAM unterzogen. Die Fluorographie dieses Experiments sowie die Coomassie-Färbung des Kontrollgels ist in **Abbildung 4.5** dargestellt. In Spur 1 ist die Methylierung der Wildtyp-Histone zu sehen. Man erkennt die Banden der methylierten Histone H3, H2A und H4. Spur 2 zeigt die Methylierung von N-terminal trunkiertem Histon H4 und den restlichen Wildtyp-Histonen. In der Coomassie-Färbung ist das kürzere Histon ΔN H4 deutlich unterhalb der anderen Histone zu sehen. In der Fluorographie ist auf dieser Höhe keine Bande sichtbar, was darauf schließen lässt, dass Histon ΔN H4 nicht methyliert wird. Spur 3 enthält die Methylierung des N-terminal trunkierten Histon H3. Wie in der Coomassie-Färbung zu sehen ist, lief das trunkierte H3 genau auf Höhe des Wildtyp-Histons H4 und ist deshalb von diesem nur schwer zu unterscheiden. Daher kann zur Fluorographie auch keine eindeutige Aussage gemacht werden, ob die Signalbande auf dieser Höhe vom ΔN Histon H3 herrührt, oder ausschließlich vom Wildtyp Histon H4. Allerdings ist dieses Signal nicht stärker, als

das wt H4 Signal in Spur 1, was den Schluss erlaubt, dass es doch lediglich vom Wildtyp H4 stammt und nicht zusätzlich vom Δ N Histon H3.

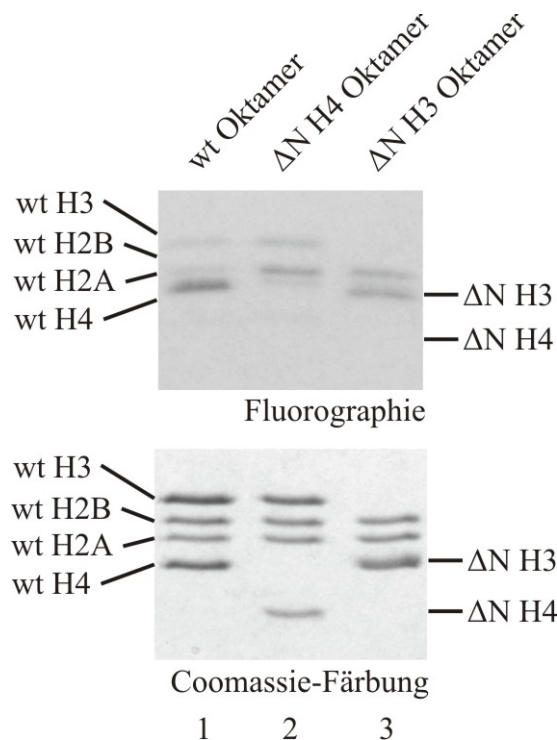


Abbildung 4.5: PRMT6 methyliert *in vitro* den N-Terminus von Histonen

Oben: Fluorographie einer Methyltransferasereaktion mit PRMT6. Je 5 μ g Wildtyp (wt) Oktamer (Spur 1), Δ N H4 Oktamer und Δ N H3 Oktamer wurden mit 20 μ l aufgereinigter GST-PRMT6 und 1 ml 14 C-SAM bei 30°C für 2 h inkubiert (s. 3.3.20). Die Histone wurden einer Gelelektrophorese (17,5%) und anschließend einem Western-Blot auf PVDF-Membran unterzogen (s. 3.3.7). Die Exposition der Fluorographie betrug 12 h (s. 3.3.21).

Unten: Coomassie-Färbung. Für das Kontrollgel wurden die oben genannten Mengen an Histon-Oktamer aufgetragen.

Dieses Experiment zeigte dennoch, dass zu mindestens im Falle von Histon H4 die Methylierungsstelle von PRMT6 im N-terminalen Bereich liegt. Bei Histon H3 konnte aufgrund der ungünstigen Laufhöhe nicht eindeutig geklärt werden, ob bei diesem die Methylierung ebenfalls im N-Terminus stattfindet.

4.1.2.2 Identifikation der von PRMT6 methylierten Arginine in Histon N-termini mittels Edman-Degradation

Das Methyltransferaseexperiment an den N-terminal trunkeierten Histonen hat gezeigt, dass die Methylierungsstelle für Histon H4 im N-Terminus des Proteins liegt. Da dieser Bereich in Histonen von einigen PRMTs und vielen anderen Methyltransferasen

modifiziert wird, lag die Vermutung nahe, dass auch die Methylierungsstelle von PRMT6 in den Histonen H3 und H2A N-terminal liegen.

Die Methode der Wahl um den N-terminalen Teil eines Proteins Aminosäure für Aminosäure zu untersuchen, ist die Edman-Degradation. Dabei wird pro Sequenzierschritt die N-terminal äußerste Aminosäure von einem Reagenz (Phenylisothiocyanat) gebunden und danach so abgespalten, dass die nächste Aminosäure ihre Aminogruppe noch behält und deshalb im folgenden Sequenzierzyklus wiederum vom Reagenz gebunden werden kann. Die abgespaltene Aminosäure bildet mit dem Reagenz eine Verbindung, welche in der HPLC detektiert und identifiziert werden kann. Man erhält dadurch einzelne Fraktionen mit den Aminosäuren des Proteins entsprechender Sequenz. Mit dieser Methode können bis zu 50 Aminosäuren sequenziert werden. Hier wurden allerdings nur 30 bzw. 25 Zyklen angewendet, was der Länge der jeweiligen Histon N-Termini entsprach.

Um damit eine Methylierungsstelle zu identifizieren, wurden Histone einer Methyltransferasereaktion durch PRMT6 unterzogen. Als Methylgruppendonator wurde dabei radioaktiv markiertes S-Adenosyl-L-[methyl- ^3H]-methionin (^3H -SAM) verwendet. Wurde dabei ein Arginin im N-Terminus durch PRMT6 methyliert, trug dieses Arginin danach die radioaktive C^3H_3 -Markierung. Diese Histonprobe unterzog man anschließend der Edman-Sequenzierung und erhielt die einzelnen Aminosäurefraktionen. Durch Messung der Radioaktivität der erhaltenen Fraktionen im Szintillationszähler konnte genau ermittelt werden, welche Aminosäure die ^3H -Methyl-Markierung trug und somit der Methylierungsstelle entsprach. Für dieses Experiment nutzte man ^3H als radioaktive Markierung, da es aufgrund seiner höheren spezifischen Aktivität im Szintillationszähler gut zu detektieren ist. Die Edman-Sequenzierung wurde von Dr. Emile Schiltz an der Universität Freiburg durchgeführt (s. 3.3.28).

Für die Methyltransferase-Reaktion wurden die zu sequenzierenden Histone H3, H4 und H2A mit ^3H -SAM eingesetzt. Als Enzymquelle nutzte man wiederum aufgereinigtes GST-PRMT6 und inkubierte die Reaktion bei 30°C über Nacht, um die Methylierungsausbeute zu maximieren. Die Reaktionsmischung wurde dann per 17,5%igen Gelelektrophorese aufgetrennt und im Western-Blot Verfahren auf PVDF-Membran transferiert. Die Histone wurden mittels Ponceau-Färbung sichtbar gemacht, die entsprechenden Membranstücke ausgeschnitten und zur Edman-Sequenzierung (30 Zyklen) geschickt. Die erhaltenen Aminosäurefraktionen wurden nach 3.3.23 in 50% Acetonitril aufgenommen, in Szintillationsverstärkerlösung gegeben und im

Szintillationszähler vermessen. Die Ergebnisse der Histon H3-Sequenzierung sind in **Abbildung 4.6** zu sehen.

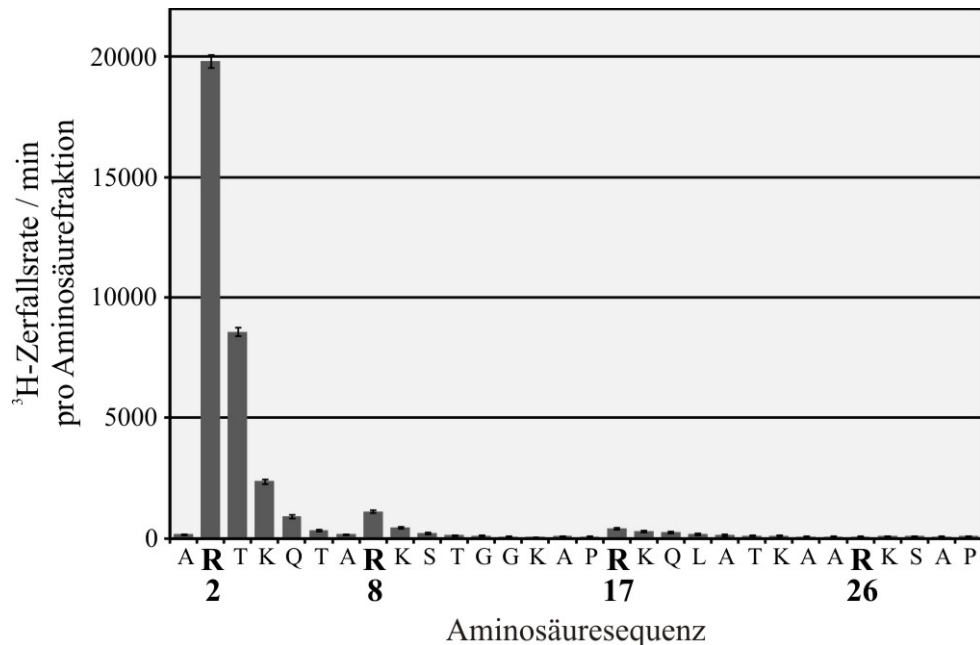


Abbildung 4.6: PRMT6 methyliert Arginin 2 in Histon H3

Szintillationszählung der ³H-Zerfallsrate/min pro Edman Aminosäurefraktion. 20 µg Histon H3 aus Kalbsthymus wurden durch 20 µl aufgereinigtem GST-PRMT6 mit 4 µl ³H-SAM (4µCi) über Nacht bei 30°C methyliert (s. 3.3.20), durch Gelelektrophorese aufgetrennt und auf PVDF-Membran transferiert. Das Histon wurde durch Ponceau-Färbung (s. 3.3.9) sichtbar gemacht, die entsprechenden Membranstücke ausgeschnitten und zur Edman-Sequenzierung (30 Zyklen) geschickt (s. 3.3.28). Die Aminosäurefraktionen des Edman-Abbaus wurden im Szintillationszähler auf ihren ³H-Zerfallsrate/min vermessen (s. 3.3.23).

Es ist deutlich zu erkennen das Fraktion Nr.2, welche der Aminosäure R2 entspricht die höchste Zerfallsrate besaß. Die folgenden Fraktionen Nr. 3 – 5 lieferten zwar auch Signale, diese rühren aber von der unvollständigen Abspaltung in jedem Edman-Sequenzierschritt her. Diese zusätzlichen Signale wurden also von radioaktiv methyliertem R2 verursacht, welches erst in den Zyklen 3 - 5 abgespalten wurde. Weitere Argininfraktionen wie beispielsweise R8 oder R17 lieferten ebenfalls Signale, aber diese waren im Vergleich zu R2 sehr gering. Damit wurde mit R2 die einzige Methylierungsstelle von PRMT6 in Histon H3 identifiziert.

Das hier sequenzierte Histon H3 stammte aus Kalbsthymus. Im Falle von Histon H4 bzw. H2A ergab sich hier ein Problem, da diese Histone in Säugerzellen an ihren N-terminalen Aminosäuren, in diesem Fall Serin, an der Aminogruppe acetyliert

Ergebnisse

vorliegen. Diese Acetylierung verhinderte eine erfolgreiche Edman-Degradation, da das Phenylisothiocyanat-Reagenz nicht mehr an diese Aminogruppe binden konnte. Zur Sequenzierung dieser beiden Histone wurden daher aus Bakterien aufgereinigte rekombinante *Drosophila* Histone verwendet, die in ihrer N-terminalen Sequenz mit denen von Säugern übereinstimmen. Die restliche Vorgehensweise entsprach der Analyse des Histons H3. Die Szintillationsmessung des Edman-sequenzierten Histons H4 ist in **Abbildung 4.7** dargestellt.

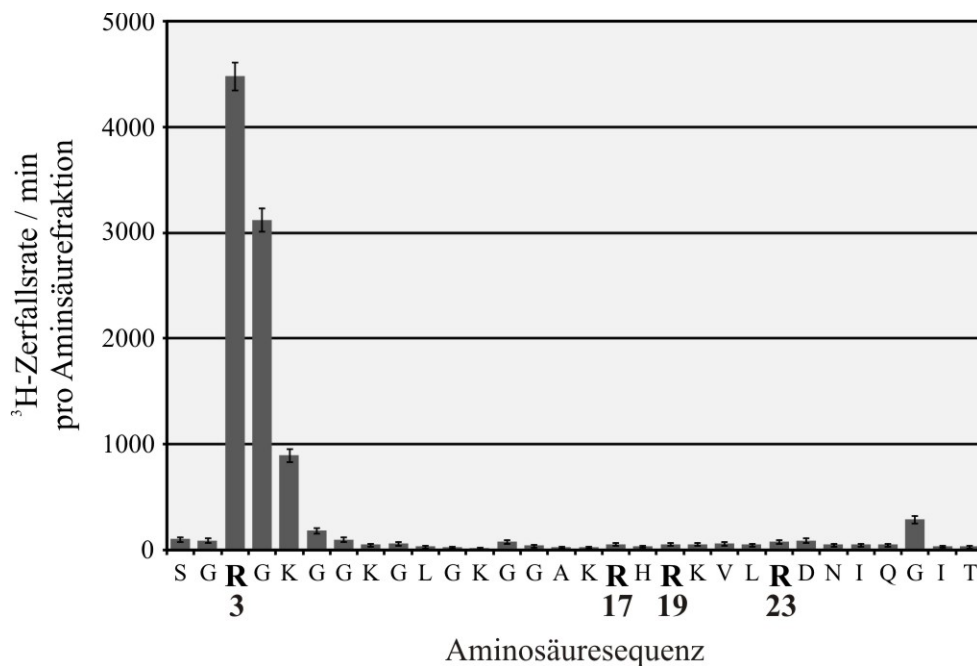


Abbildung 4.7: PRMT6 methyliert Arginin 3 in Histon H4

Szintillationszählung der ³H-Zerfallsrate/min pro Edman Aminosäurefraktion. 20 µg rekombinantes *Drosophila* Histon H4 aus Bakterien wurden durch 20 µl aufgereinigtem GST-PRMT6 mit 4 µl ³H-SAM (4µCi) über Nacht bei 30°C methyliert (s. 3.3.20), durch Gelelektrophorese aufgetrennt und auf PVDF-Membran transferiert. Das Histon wurde durch Ponceau-Färbung sichtbar gemacht, die Membranstücke ausgeschnitten und zur Edman-Sequenzierung (30 Zyklen) geschickt (s. 3.3.28). Die Aminosäurefraktionen des Edman-Abbaus wurden im Szintillationszähler auf ihren ³H-Zerfallsrate/min vermessen (s. 3.3.23).

Auch im Falle von Histon H4 zeigte nur eine Aminosäurefraktion ein eindeutiges Signal. Hier war es R3 welches die höchste Radioaktivität aufwies. Die zusätzlichen Signale in den nachfolgenden Fraktionen waren ebenfalls wieder zu erkennen. Weitere schwache Signale wie sie bei Histon H3 auftraten, waren hier nicht zu sehen. Somit ist R3 die Methylierungsstelle von PRMT6 in Histon H4.

Nach demselben Muster wurde dann letztlich auch Histon H2A analysiert (s. **Abbildung 4.8**), wobei hier nur 25 Zyklen angewendet wurden.

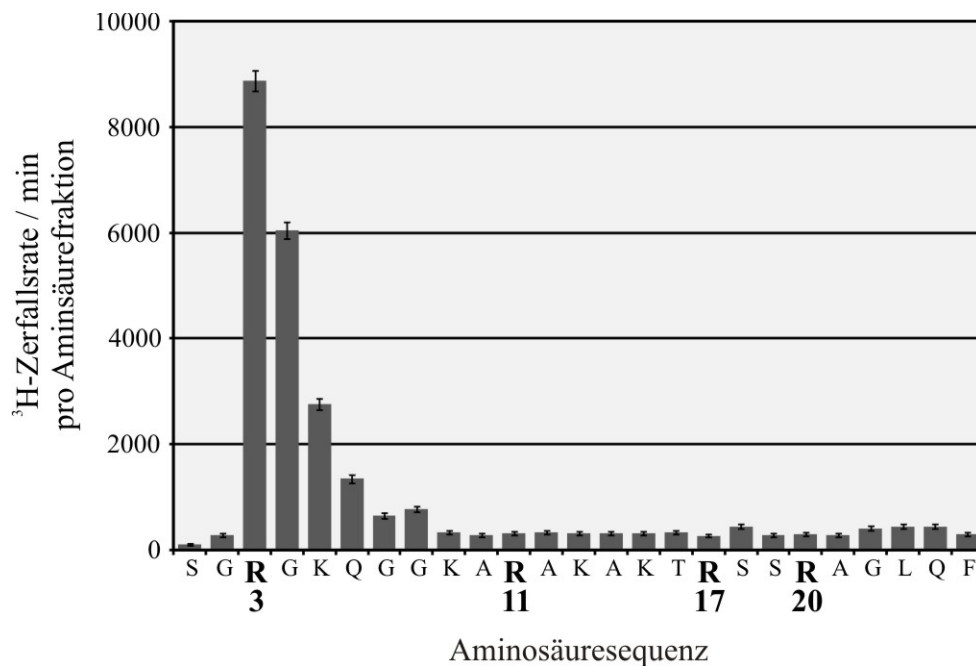


Abbildung 4.8: PRMT6 methyliert Arginin 3 in Histon H2A

Szintillationszählung der ^3H -Zerfallsrate/min pro Edman Aminosäurefraktion. 20 μg rekombinantes *Drosophila* Histon H2A aus Bakterien wurden durch 20 μl aufgereinigtem GST-PRMT6 mit 4 μl ^3H -SAM (4 μCi) über Nacht bei 30°C methyliert (s. 3.3.20), durch Gelelektrophorese aufgetrennt und auf PVDF-Membran transferiert. Das Histon wurde durch Ponceau-Färbung sichtbar gemacht, die Membranstücke ausgeschnitten und zur Edman-Sequenzierung (25 Zyklen) geschickt (s. 3.3.28). Die Aminosäurefraktionen des Edman-Abbaus wurden im Szintillationszähler auf ihren ^3H -Zerfallsrate/min vermessen (s. 3.3.23).

Bei Histon H2A ist es ebenfalls nur eine Aminosäurefraktion, welche ein einzelnes Signal liefert. Wie auch bei Histon H4 liegt die Methylierungsstelle in Histon H2A bei R3.

Die restlichen Membranstücke, welche für die Edman-Sequenzierung verwendet wurden, enthielten noch die Histone ohne ihre N-Termini. Diese Membranen wurden zur Kontrolle ebenfalls im Szintillationszähler auf ihre Restradioaktivität vermessen. Im Falle von Histon H3 und H4 ergab diese Messung lediglich Hintergrundstrahlung, welche im Vergleich zu den Signalen der methylierten Arginine (R2 bzw. R3) sehr gering war. Bei Histon H2A allerdings betrug die Restradioaktivität einen nicht zu vernachlässigenden Anteil verglichen mit der für R3 detektierten Zerfallsrate, was auf eine potentielle Methylierung des globulären Teils bzw. des C-Terminus von H2A hinweist.

Durch diese Experimente wurden die Methylierungsstellen von PRMT6 im N-Terminus von Histonen identifiziert. PRMT6 methylierte R2 in Histon H3 und R3 in den Histonen H4 und H2A.

4.1.2.3 Nachweis der Arginin 2 Methylierung durch PRMT6 *in vivo*

Parallel zu den hier gezeigten *in vitro* Experimenten, konnte in unserer Gruppe durch die Arbeiten von Claudia Stein (AG Prof. Bauer, (Hyllus et al. 2007)) die *in vivo* Relevanz der PRMT6 Methylierung bezüglich H3R2 gezeigt werden. Durch den Einsatz von PRMT6-Überexpression in humanen Zellen wurde gezeigt, dass die Menge an methyliertem R2 am Chromatin anstieg, sobald vermehrt PRMT6 in der Zelle vorlag. Umgekehrt konnte Claudia Stein nachweisen, dass eine Depletion von PRMT6 durch RNAi-Technik zu einer Verminderung der methylierten R2 Mengen am Histon H3 führte. Diese Zu-/Abnahme der R2 Methylierung konnten ebenfalls durch Immundetektion und Immunfluoreszenzaufnahmen dargestellt werden. PRMT6 ist also auch *in vivo* die Methyltransferase die R2 in Histon H3 methyliert.

4.1.3 Charakterisierung der Methylierungspräferenz von PRMT6

Da PRMT6 als neue Histonmethyltransferase charakterisiert und die Zielarginine identifiziert waren, sollte als nächstes herausgefunden werden, ob PRMT6 die Mono-, die Dimethylierung oder beides katalysiert. Laut Literatur gehört PRMT6 zur Gruppe der Typ I Argininmethyltransferasen (Frankel et al. 2002), d.h. es überträgt zwei Methylgruppen auf dasselbe Stickstoffatom der Argininseitenkette (s. 1.1.5). Daraus resultiert ein asymmetrisch methyliertes Arginin. Diese Reaktion besteht aus zwei getrennten Schritten, zuerst der Monomethylierung und anschließend der Dimethylierung des Stickstoffatoms (s. 1.1.3). Es stellte sich also die Frage, ob PRMT6 eine der beiden Teilreaktionen bevorzugt katalysiert.

4.1.3.1 Analyse der Methylierungspräferenz von PRMT6 mittels Szintillationsmessung

Zu diesem Zweck wurden weitere Methyltransferase-Reaktionen mit aufgereinigter GST-PRMT6 als Enzymquelle durchgeführt. Dabei wurden anstatt von Histonen als Substrate synthetisierte Peptide eingesetzt. Diese Peptide entsprachen den N-Termini der jeweiligen Histone, waren aber teilweise an einigen Aminosäuren schon vormodifiziert. Die hierfür eingesetzten Histon H3 Peptide waren an Aminosäure R2 entweder unmodifiziert, monomethyliert oder asymmetrisch dimethyliert. Bei Histon H4 Peptiden entsprechend an R3. Nach der Methylierung dieser Peptide durch PRMT6

mit ^3H -SAM wurden diese im Szintillationszähler auf ihre ^3H -Zerfallsrate vermessen (s. 3.3.22). Dies war ein Maß für die Methylierung der Peptide und konnte somit verwendet werden, um zu bestimmen, welches Peptid von PRMT6 als Substrat bevorzugt wird.

Die Peptide wurden mit aufgereinigter GST-PRMT6 und ^3H -SAM methyliert, durch Gelelektrophorese (20%) aufgetrennt, im Western-Blot auf PVDF-Membran transferiert und mit Ponceau-Färbung sichtbar gemacht. Die entsprechenden Membranbereiche, die die Peptide trugen, wurden anschließend im Szintillationszähler analysiert. Das Resultat dieser Messung ist in **Abbildung 4.9** zu sehen. Da PRMT6 Automethylierungsaktivität besitzt, also Arginine seiner eigenen Sequenz methylieren kann, wurde diese Automethylierung ohne Peptidsubstrat in Δ ebenfalls gemessen. Es zeigte sich, dass sowohl für das H3- und H4-Peptid PRMT6 eine Methyltransferaseaktivität gegenüber den unmodifizierten Peptiden aufweist. Diese ist aber für die am Arginin monomethyliert vorliegenden Peptide ungleich höher. Der hier gezeigte Unterschied der PRMT6-Aktivität von ca. 50% vom monomethylierten zum unmethylierten Peptid ist exemplarisch, es wurden auch bis zu 30% verminderte Aktivitäten gemessen (nicht gezeigte Daten). Die am Arginin dimethylierten Peptide wurden gar nicht oder nur kaum von PRMT6 methyliert.

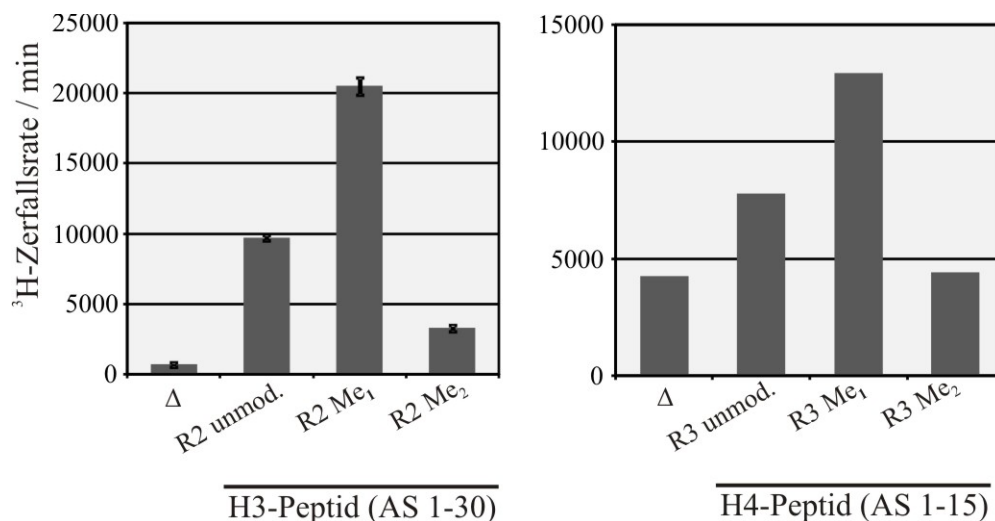


Abbildung 4.9: PRMT6 methyliert bevorzugt mono-methylierte Arginine in Histonpeptiden

Szintillationsmessung von durch PRMT6 methylierten Peptiden. 4 μg Histon H3 Peptide (AS 1-30) bzw. Histon H4 Peptide (AS 1-15) wurden mit 10 μl aufgereinigtem GST-PRMT6 und 1 μl ^3H -SAM für 2 h bei 30°C methyliert (s. 3.3.20). Die Peptide wurden einer Gelelektrophorese (20%), einem Western-Blot auf PVDF-Membran sowie einer Ponceau-Färbung unterzogen. Die das Peptid enthaltenden Membranstücke wurden im Szintillationszähler auf ihre ^3H -Zerfallsrate vermessen (s. 3.3.22). In Δ wurde nur die PRMT6 Automethylierung detektiert.

PRMT6 wies gegenüber den am jeweiligen Arginin monomethyliert vorliegenden Peptiden die höchste Methylierungsaktivität auf. Höher sogar als gegenüber den unmodifizierten Peptiden. Dies lässt darauf schließen, dass PRMT6 bevorzugt den zweiten Schritt, also die Dimethylierung des Methylgruppentransfers katalysiert.

4.1.3.2 Analyse der Methylierungspräferenz von PRMT6 durch massenspektroskopische Analyse

Um diese Methylierungspräferenz von PRMT6 zu bestätigen, sollte das Ergebnis der Szintillationsmessungen nun mittels Massenspektroskopie überprüft werden. Dazu wurden diesmal nur die H3-Peptide verwendet, welche am R2 unmodifiziert, monomethyliert oder asymmetrisch dimethyliert vorlagen. Als Methylgruppendonator wurde allerdings kein radioaktives Reagenz sondern das stabile S-Adenosyl-methionin Derivat SAM- *p*-Toluenesulfonat (SAM-pTS) verwendet, welches kein radioaktives Isotop enthielt. Die Reaktion wurde über Nacht durchgeführt. Die Reaktionsmischung wurde direkt zur Massenspektroskopie bei Prof. Axel Imhof in München geschickt, wo die Masse der Peptide untersucht wurde (s. 3.3.29). Außerdem wurden zur Kontrolle die reinen Peptide ohne Methylierung durch PRMT6 analysiert.

Abbildung 4.10 zeigt das Ergebnis dieser Untersuchung. Die obere Reihe (Δ PRMT6) stellt die Massen der einzelnen Peptide vor der Methylierung durch PRMT6 dar, während in der unteren Reihe (+ PRMT6) die Peptide nach Methylierung zu sehen sind. Dabei erkennt man die Masse der Peptide, die nicht methyliert wurden, wie auch die Masse der Methylierungsprodukte. Vergleicht man in **Abbildung 4.10 A** die Methylierung des unmodifizierten H3-Peptids so erkennt man in der unteren Reihe das Reaktionsprodukt (*), nämlich das monomethylierte H3-Peptid. Die Bildung des dimethylierten Produktes konnte nicht nachgewiesen werden. In **Abbildung 4.10 B** sieht man die Methylierung des vormodifizierten monomethylierten Peptids. Die Bildung des dimethylierten Reaktionsproduktes (**) ist hier deutlich zu sehen, im Gegensatz zum unmodifizierten Peptid in A. In **Abbildung 4.10 C** wurde die Masse des dimethylierten Peptids ermittelt. Hierbei ist nach der Inkubation keinerlei Produktsignal zu erkennen. Wenn man nun die Signale der beiden Produkte (*) und (**) vergleicht, wird deutlich, dass PRMT6 mehr Methylierungsprodukt erzeugt, falls das monomethylierte Peptid als Substrat vorliegt. Ausserdem konnte die Dimethylierung eines unmodifizierten Peptids durch PRMT6 nicht nachgewiesen werden.

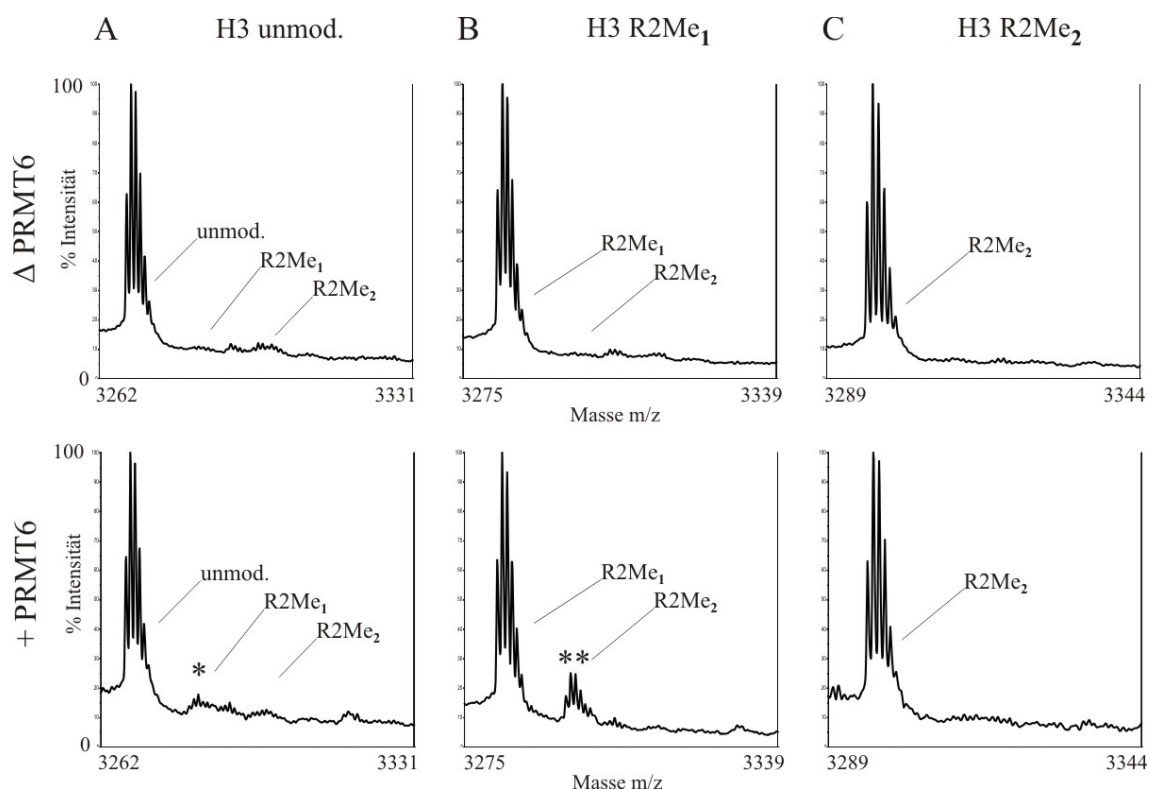


Abbildung 4.10: Massenspektroskopische Analyse der Methylierungspräferenz von PRMT6

Massenspektroskopische Analyse der von PRMT6 methylierten H3-Peptide. 10 µg Histon H3 Peptid (AS 1-30) wurden mit 30 µl aufgereinigtem GST-PRMT6 und 6 µl SAM-pTS über Nacht bei 30°C methyliert. Die Masse der Peptide wurde direkt aus der Reaktionsmischung durch MALDI-TOF Analyse (s. 3.3.29) ermittelt. Δ PRMT6: Masse der H3-Peptide vor Methylierung durch PRMT6. + PRMT6: Masse der H3-Peptide nach Methylierung durch PRMT6.

Dies bestätigt die zuvor gemachte Aussage, dass PRMT6 monomethylierte Arginine als Substrate gegenüber den unmodifizierten bevorzugt.

4.1.4 Einfluss anderer Histonmodifikationen auf die PRMT6-Methylierungsaktivität

In den folgenden Experimenten sollte geklärt werden, ob PRMT6 nicht nur gegenüber der Modifikation, die es selbst katalysiert Präferenzen besitzt, sondern ob die Methyltransferaseaktivität von PRMT6 auch vom Methylierungsstatus benachbarter Modifikationen im Histon H3 N-Terminus abhängt. Als zu untersuchende Histonmodifikationen wurden die Methylierungen an K4 und K9 in Histon H3 gewählt, da diese in direkter Nachbarschaft liegen, sowie die Methylierung von H3K27. Der

Einfluss der Modifikationen an K4 bzw. K27 wurden auch deswegen untersucht, da aus den Arbeiten von E. Guccione (Guccione et al. 2006) bekannt war, dass die H3R2-Dimethylierung sich mit der H3K4-Trimethylierung an bestimmten Genabschnitten ausschließt, während H3R2Me₂ und H3K27Me₃ dort zusammen vorkommen können. Eine Beeinflussung der PRMT6-Aktivität auf R2 durch andere Modifikationen entspräche einer Eigenschaft des Histoncodes, wie man sie beispielsweise im Falle der K9 Methylierung schon gefunden hat (s. 1.2.2).

Zu diesem Zweck wurden abermals synthetisch vormodifizierte Histon H3-Peptide als Substrate in Methyltransferasereaktionen mit PRMT6 verwendet und die Übertragung von radioaktiv markierten Methylgruppen auf das R2 gemessen. Die Durchführung dieser Experimente entsprach der aus 4.1.3.1. Die Peptide wurden mit ³H-SAM von GST-PRMT6 methyliert, auf ein Gel (20%) aufgetragen, auf Membran transferiert und im Szintillationszähler analysiert. Die gemessenen Zerfallsraten sind in **Abbildung 4.11** aufgeführt.

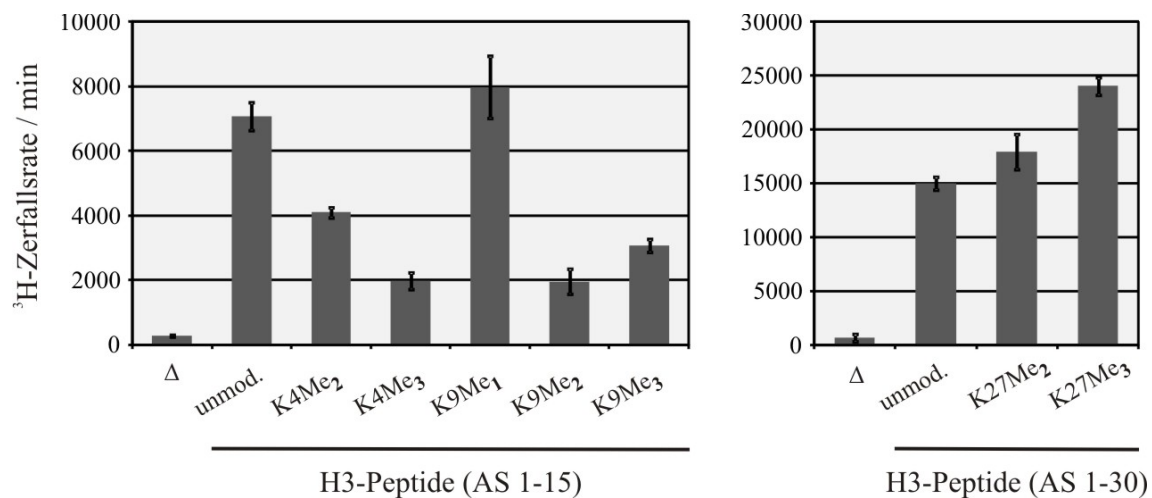


Abbildung 4.11: PRMT6 Methyltransferaseaktivität wird von anderen Histonmodifikationen beeinflusst

Szintillationsmessung von durch PRMT6 methylierten Peptiden. 4 μ g Histon H3 Peptide (AS 1-15 bzw. AS 1-30) wurden mit 10 μ l aufgereinigtem GST-PRMT6 und 1 μ l ³H-SAM für 2h bei 30°C methyliert (s. 3.3.20). Die Peptide wurden einer Gelelektrophorese (20%), einem Western-Blot auf PVDF-Membran sowie einer Ponceau-Färbung unterzogen. Die das Peptid enthaltenden Membranstücke wurden im Szintillationszähler auf ihre ³H-Zerfallsrate vermessen (s. 3.3.22). In Δ wurde die PRMT6 Automethylierung detektiert.

Vergleicht man die ^3H -Zerfallsrate der jeweils unmodifizierten Peptide mit denen, die eine Methylierung trugen, erkennt man im Falle der K4 Methylierung, dass dort PRMT6 nicht mehr so effektiv Methylgruppen übertragen konnte. Dies ist ebenfalls für die K9 Methylierung zu erkennen. Je stärker diese Aminosäurereste methyliert vorlagen, umso weniger Aktivität zeigte PRMT6 gegenüber dem Histonpeptid. Dementsprechend ist der Effekt bei den trimethylierten Peptiden am deutlichsten. Einzig das monomethylierte K9 hatte keinen Effekt. Bei der K27 Methylierung trat der umgekehrte Fall auf. Hier nahm die Fähigkeit des PRMT6 das R2 zu methylieren zu, sobald das K27 methyliert vorlag. Allerdings ist der Unterschied hierbei nicht so groß wie bei den Modifikationen an K4 und K9.

Trotzdem weist die Ab- bzw. Zunahme der H3R2-spezifischen PRMT6-Methyltransferaseaktivität in Anwesenheit von Methylierungen an benachbarten Aminosäureresten auf eine Beeinflussung durch diese Modifikationen hin. Dieser Effekt lieferte einen ersten Hinweis auf eine potentielle Rolle der PRMT6 im Zusammenhang des Histoncodes.

4.2 Die Rolle der Arginin 2 Dimethylierung im Histon-Code: Bindung von Proteinen an Histon N-Termini

Die Existenz der Methyl-Modifikationen am R3 in Histon H4 bzw. H2A war schon zuvor bekannt und im Falle von H4R3 intensiv untersucht. Diese Dimethylierung des R3 in Histon H4 wird neben PRMT6 auch von PRMT1 durchgeführt. Einzig für die R2 Dimethylierung in Histon H3 war das Enzym, welche diese Methylierung katalysiert unbekannt. Aus diesem Grund konzentriert sich die vorliegende Arbeit auf die Rolle der Modifikation des R2 in Histon H3.

Die Theorie des Histoncodes (s. 1.2) besagt, dass das Vorliegen einer Histonmodifikation direkt oder indirekt durch Bindung weiterer Proteine zu Veränderungen am Chromatin führt. So kann die Struktur des Chromatins aufgeweitet werden oder funktionelle Proteine (Effektorproteine) können spezifisch rekrutiert werden, was letztlich zur Regulation von Chromatin verbundenen Prozessen führt. Daher kam die Frage auf, welche Auswirkungen eine Dimethylierung am H3R2 auf zelluläre Prozesse, enzymatische Aktivitäten oder Bindungseigenschaften im

Chromatinkontext hat. Ein erster Schritt zur Beantwortung dieser Frage ist die Suche nach möglichen Bindungsproteinen, welche spezifisch an diese Modifikation R2 binden können bzw. dies nur in Abwesenheit der R2 Methylierung können.

4.2.1 Suche nach potentiellen Bindungsproteinen für dimethyliertes Arginin 2

Um Proteine zu identifizieren, welche eine bestimmte Bindungsaffinität zu Histonpeptiden aufweisen, hat sich die Methode der Peptid-Pulldowns bisher als probates Mittel erwiesen. Dabei werden die zu untersuchenden Histonpeptide an Sulfolink-Gel gebunden (s. 3.3.25), um sie später präzipitieren zu können. Diese Histonpeptide trugen entweder keine oder eben die zu untersuchende Modifikation, für die spezifische Bindungspartner vermutet werden oder die für den Verlust einer Interaktion verantwortlich sein können. Die am Sulfolink-Gel immobilisierten Peptide wurden anschließend in getrennten Experimenten mit verschiedenen Zellextrakten inkubiert und Proteine, die an den Peptiden gebunden blieben analysiert. Nach dem Waschen der Peptide wurden die noch gebundenen Proteine durch Gelelektrophorese (s. 3.3.3) aufgetrennt und in der Silberfärbung (s. 3.3.6) bzw. Immundetektion (s. 3.3.10) sichtbar gemacht.

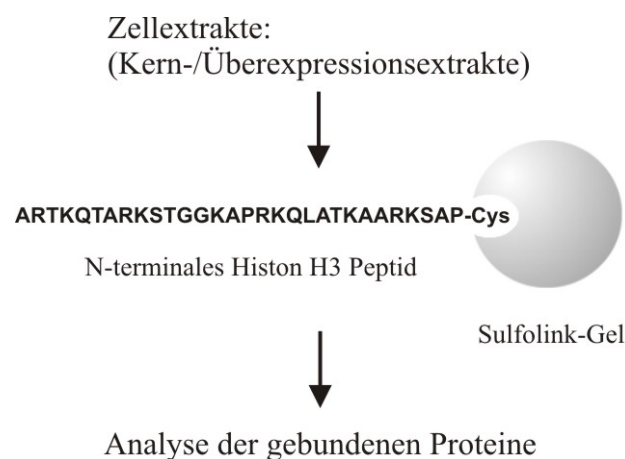


Abbildung 4.12: Schema eines Histonpeptid-Pulldowns zur Identifikation spezifischer Bindungspartner von Histonmodifikationen

Die am Sulfolink-Gel immobilisierten Histonpeptide wurden mit Zellextrakten inkubiert und anschließend gewaschen (s. 3.3.26). An den Peptiden (unmodifiziert; R2 mono-/dimethyliert; R27 di-/trimethyliert) gebundene Proteine wurden durch SDS-Probenpuffer eluiert und durch Gelelektrophorese (s. 3.3.3) und Silberfärbung analysiert (s. 3.3.6).

Die gefundenen Banden wurden auf differentiell bindende Proteine untersucht, Proteinen also, welche an den jeweils modifizierten Peptiden stärker oder schwächer binden konnten als am unmodifizierten Peptid. **Abbildung 4.12** zeigt ein vereinfachtes Schema eines „Peptid-Pulldowns“ wie er in 3.3.26 beschrieben ist. Diese Strategie wurde schon verwendet um Proteine zu identifizieren deren Bindung abhängig von der R3 Dimethylierung an Histon H4 war, die neben PRMT1 auch von PRMT6 katalysiert wird. Dabei wurde aber ein chromatographischer Ansatz gewählt, bei dem die Peptide an Minisäulen gebunden waren. Da bei dieser Methode keine spezifischen Bindungsproteine ausgemacht werden konnten (nicht gezeigte Daten), wurde dazu übergegangen die Peptide an freies Sulfolink-Gel zu koppeln und den „Pulldown“ im sogenannten „Batch“-Verfahren durchzuführen.

4.2.1.1 Histon H3-Peptid-Pulldowns mit verschiedenen Zellextrakten

Als Proteinquelle für mögliche Bindungspartner wurden humane Zellextrakte verwendet. Da von Histon-bindenden Proteinen zu erwarten ist, dass sie *in vivo* angereichert am Chromatin vorkommen, wurde Zellkernextrakt verwendet. Dieser wurde nach der in 3.3.17 beschriebenen Methode aus HEK293 Zellen präpariert, und für den Pulldown eingesetzt. Als zu untersuchende Modifikationen für dieses Experimente wurde die mono- bzw. di-Methylierung an R2 in Histon H3 gewählt. Außerdem wurde das an K27 trimethylierte Peptid eingesetzt, da man aufgrund der Ergebnisse aus 4.1.4 und der Literaturdaten von (Guccione et al. 2006) einen Zusammenhang zwischen H3R2Me₂ und H3K27Me₃ vermutete. Ob dieser Zusammenhang mit der Bindung von Proteinen an die entsprechenden Modifikationen zu erklären ist, sollte geklärt werden. Als Hintergrundkontrolle, d.h. um spezifische Interaktionspartner von Proteinen zu unterscheiden, welche nur an das Sulfolink-Gel binden, wurde ein Experiment nur mit entsprechenden Mengen ungekoppeltem Sulfolink-Gel durchgeführt.

Bei der Durchführung des Pulldowns erfolgte nach (s. 3.3.26). Das Sulfolink-Gel mit den Histonpeptiden wurde mit BSA abgesättigt. Parallel dazu wurde der einzusetzende Zellextrakt mit ungekoppeltem Sulfolink-Gel vorgereinigt. Beides diente zur Minimierung von unspezifischer Bindung an das Sulfolink-Gel. Der vorgereinigte Zellkernextrakt wurde dann zum abgesättigten Sulfolink-Gel gegeben und für 15 min inkubiert. Anschließend wurde das Sulfolink-Gel abzentrifugiert und gründlich mehrere

Ergebnisse

Male gewaschen. Die Analyse der Proteine erfolgte mittels Gelelektrophorese (10%iges Gel) und Silberfärbung der Proteinbanden. Das silbergefärbte Gel dieses Pulldowns ist in **Abbildung 4.13** dargestellt.

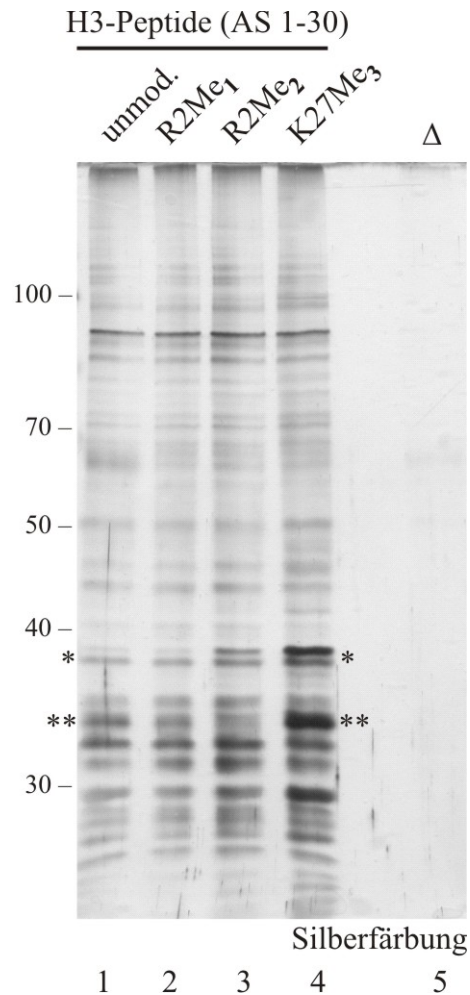


Abbildung 4.13: Histon H3 Peptid-Pulldown mit HEK293 Kernextrakt

Silberfärbung des Peptid-Pulldowns. 200µg HEK293 Kernextrakt (s. 3.3.17) wurden mit je 20µl Sulfolink-Gel mit 10µg gekoppeltem Histon H3-Peptid (AS 1-30) für 15 min bei 4°C inkubiert (s. 3.3.26). Das Sulfolink-Gel wurde 8mal mit IPH-Puffer gewaschen und die Proteine in einer 10%igen Gelelektrophorese aufgetrennt. Das Gel wurde anschließend silbergefärbt (s. 3.3.6). Δ: Leerkontrolle ohne Peptid.

Zu erkennen waren viele Proteinbanden, die in allen Spuren in vergleichbarer Stärke zu finden waren, also kein differentielles Verhalten zeigten. Die Kontrolle (Δ) war dagegen frei von Proteinen. Bei der Suche nach differentiellen Banden fielen zwei Proteinbanden bei ca. 38 kDa (*) auf und eine weitere bei ungefähr 35 kDa (**). Dabei zeigten diese ein unterschiedliches Bindungsmuster. Die beiden oberen Banden (*) waren in Spur 1 (unmod.) recht schwach zu sehen. In Spur 2 (R2Me₁) waren sie

ebenfalls noch undeutlich zu erkennen, während sie in Spur 3 (R2Me₂) an Intensität gewannen und in der letzten Spur 4 (K27Me₃) am stärksten angefärbt waren. Die einzelne Bande (**) bei 35 kDa dagegen war in Spur 1 (unmod.) deutlich zu sehen, schien aber in Spur 2 (R2Me₁) und noch mehr in Spur 3 (R2Me₂) schwächer zu werden. In Spur 4 (K27Me₃) war diese dann wie auch die beiden oberen Banden am besten zu sehen.

Die beiden oberen Banden (*) entsprächen also einem Protein, dessen Bindungsaffinität zu Histon N-Termini durch eine Dimethylierung an R2 oder Trimethylierung an K27 verstärkt wird. Die untere Bande (**) stünde dementsprechend für ein Bindungsprotein, dessen Fähigkeit Histon N-Termini zu binden durch die Dimethylierung an R2 vermindert bzw. durch die Trimethylierung an K27 verstärkt wird. Weitere differentielle Proteinbanden waren in diesem Experiment nicht zu erkennen.

Um die gefundenen differentiellen Banden zu verifizieren und um nach weiteren zu suchen, wurden in den folgenden Pulldown-Experimenten andere humane Zellen verwendet, um aus diesen Extrakte herzustellen. Es wurden zum einen MCF-7 Zellen sowie NT2/D1 Zellen herangezogen. Es wurde außerdem kein Kernextrakt mehr präpariert, sondern lediglich Gesamtzellextrakt (s. 3.3.16), da sich das Pulldownmuster dieser beiden Extraktionsmethoden nicht voneinander unterschied (nicht gezeigte Daten). Der Pulldown wurde entsprechend dem vorangehenden Experiment durchgeführt, mit dem Unterschied, dass das H3R2Me₁-Peptid nicht verwendet wurde. Hinzu kam eine Benzonasebehandlung der Zellextrakte, um unerwünschte Protein-DNA-Interaktionen auszuschließen (s. 3.3.16). **Abbildung 4.14** stellt die Silberfärbungen der Experimente mit den Extrakten aus MCF-7 (**A**) bzw. NT2/D1 (**B**) Zellen dar.

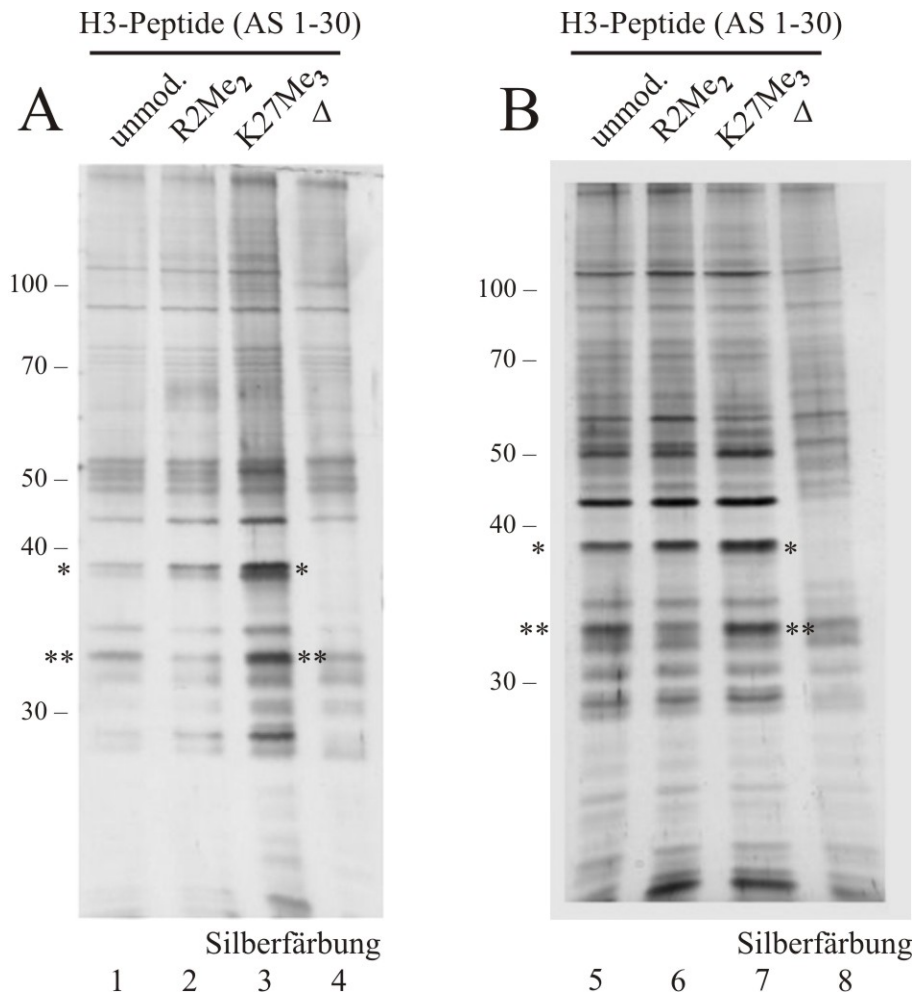


Abbildung 4.14: Histon H3 Peptid-Pulldown mit MCF-7 Extrakt (A) bzw. NT2/D1 Extrakt (B)

Silberfärbung des Peptid-Pulldowns. 200µg MCF-7 Gesamtzellextrakt (s. 3.3.16) (A) bzw. 150µg NT2/D1 Gesamtzellextrakt (B) wurden mit je 20µl Sulfolink-Gel mit 10µg gekoppeltem Histon H3-Peptid (AS 1-30) für 15 min bei 4°C inkubiert (s. 3.3.26). Das Sulfolink-Gel wurde 8mal mit IPH-Puffer gewaschen und die Proteine in einer 10%igen Gelelektrophorese aufgetrennt. Das Gel wurde anschließend silbergefärbt (s. 3.3.6). Δ: Leerkontrolle ohne Peptid.

Es traten in beiden Experimenten wieder die Banden (*) auf, die bei den R2Me₂- (Spur 2 und 6) bzw. K27Me₃-Peptiden (Spur 3 und 7) stärker vorliegen, als beim unmodifizierten Peptid (Spur 1 und 5). Allerdings war im Falle des NT2/D1 Extrakts (B) der Effekt nicht so deutlich wie zuvor beobachtet, und es war auch nur eine Bande dieses Typs zu sehen. Die Proteinbande (**), welche zuvor den Effekt zeigte am R2Me₂-Peptid (Spur 2 und 6) schwächer zu sein, trat hier sowohl bei dem MCF-7 (A) wie auch beim NT2/D1 Extrakt (B) auf. Damit konnten die Aussagen des ersten Pulldowns mit HEK293 Extrakt (Abbildung 4.13) bestätigt werden.

4.2.1.2 Massenspektroskopische Identifizierung der differentiell bindenden Proteine

Es stellte sich nun die Frage nach der Identität dieser Proteine, die möglicherweise differentiell bindende Interaktionspartner darstellten. Um den Banden Proteine zuordnen zu können, sollten diese einer massenspektroskopischen Analyse unterzogen werden. Dazu wurde das erste Pulldown-Experiment mit HEK293 Kernextrakt wiederholt, und die interessanten Proteinbanden aus dem Gel ausgeschnitten. Da für die Massenspektroskopie Silberfärbungen nicht möglich waren, musste das Gel mittels colloidalem Coomassie (s. 3.3.5) angefärbt werden. Aufgrund der geringeren Sensitivität dieser Färbemethode wurden größere Mengen an Protein für dieses Experiment eingesetzt. Dazu wurden die Experimentansätze verdreifacht, indem man pro Pulldown-Bedingung drei getrennte Experimente durchführte und diese nach erfolgreichem Pulldown vereinigte.

Der Scan dieses Gels ist in **Abbildung 4.15** dargestellt. Auch in diesem Experiment wurden die Ergebnisse der vorangehenden Peptid-Pulldowns reproduziert. Die beiden Banden (*) bei 38 kDa waren wieder zusehen und zeigten das bekannte Bindungsmuster, Zunahme der Bandenintensität beim R2Me₂- (Spur 2) und K27Me₃-Peptid (Spur 3). Das Protein auf Höhe von 35 kDa (**) trat ebenfalls wieder auf und war auch hier im Falle des R2Me₂-Peptids (Spur 2) schwächer zu sehen, als bei den beiden anderen Peptiden (Spur 1 und 3).

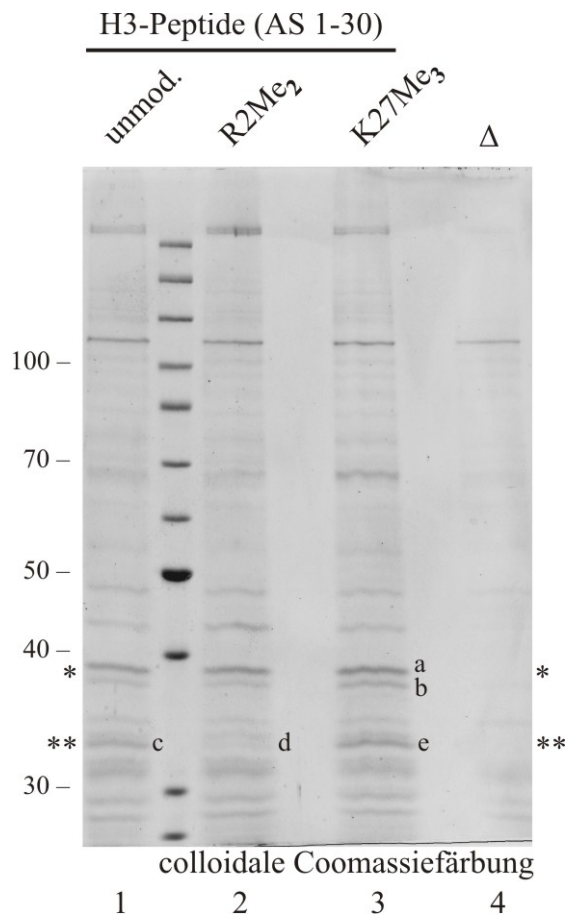


Abbildung 4.15: Histon H3 Peptid-Pulldown zur massenspektroskopischen Identifikation potentieller Bindungspartner

Colloidale Coomassiefärbung des Peptid-Pulldowns. 3x200µg HEK293 Kernextrakt (s. 3.3.17) wurden mit je 3x20µl Sulfolink-Gel (30µg gekoppeltem Histon H3-Peptid) für 15 min bei 4°C inkubiert (s. 3.3.26). Das Sulfolink-Gel wurde 8mal mit IPH-Puffer gewaschen und die Proteine einer 10%igen Gelelektrophorese unterzogen. Das Gel wurde anschließend mit colloidalem Coomassie gefärbt (s. 3.3.5), die gewünschten Proteinbanden (a – e) ausgeschnitten und zu massenspektroskopischen Analyse geschickt. Δ: Leerkontrolle ohne Peptid.

Um diese Proteine zu identifizieren, mussten die entsprechenden Banden aus dem Gel ausgeschnitten werden und zur massenspektroskopischen Analyse geschickt werden. Diese wurde von Dr. Eberhard Krause (s. 3.3.30). durchgeführt. Dies ergab für jede Bande eine Liste von Proteinen, deren Peptide in dieser Bande gefunden wurden. Um eine Vorauswahl zu treffen, wurden Proteine deren Molekulargewicht nicht mit der Laufhöhe auf dem Gel übereinstimmte ausgeschlossen. Desweiteren wurden Proteine wie Keratin oder BSA als Verunreinigungen eingestuft. Ausschlaggebend für die Zuordnung der Banden zu bestimmten Proteinen war der „Score“ der MS-Analyse. Dieser ist ein Maß für die Signifikanz des angegebenen Proteins. Die schlussendliche

Zuweisung von identifizierten Proteinen zu den gefundenen Banden ist in **Tabelle 4.1** zusammengefasst.

Bande	Identifiziertes Protein	Größe	identifizierte Peptide	Score
a	SET Protein (Template activating factor I / TAF)	33kDa	59	2041
b	Nucleophosmin (NPM / B23)	33kDa	98	3242
c	Methyl-CpG-binding protein (MBD3)	33kDa	14	752
d	Methyl-CpG-binding protein (MBD3)	33kDa	2	57
e	Methyl-CpG-binding protein (MBD3)	33kDa	24	1128

Tabelle 4.1: Ergebnisse der massenspektroskopischen Analyse der differentiellen Proteinbanden

Im Falle der Banden a und b war die Identifizierung recht eindeutig, da in beiden Fällen die gefundenen Proteine den höchsten Score und die größte Anzahl gefundener Peptide aufzuweisen hatten. Die beiden Proteine, die in den Pulldown-Experimenten das Bindungsmuster zeigten durch Methylierungen an R2 bzw. K27 an Bindungsaffinität zu gewinnen (Bande *), wurden also als SET Protein bzw. Nucleophosmin (NPM) identifiziert.

Die Zuordnung eines Proteins zum zweiten Bandentypus (**), welcher am R2 am schwächsten erschien war schwieriger. Hier wurden alle drei Banden für alle drei Pulldown-Experimente untersucht. Dabei fand sich kein Protein, welches mit eindeutig höchstem Score für alle drei Bedingungen zuzuweisen war. Allerdings fiel auf, dass die Anzahl gefundener Peptide im Falle des Proteins MBD3 mit dem Bindungsmuster übereinstimmte, nämlich dass beim R2Me₂-Peptid die Bande am schwächsten war. Dies traf auch für die Anzahl der als MBD3 identifizierten Peptide in dieser Bande (d) zu, während die beiden anderen Banden höhere Peptidzahlen und Scores aufwiesen. Daher wurde für dies Bande MBD3 als wahrscheinlichstes Protein angenommen.

Diese Ergebnisse führten zu dem Schluss, dass SET und Nucleophosmin womöglich Proteine sind, die an Histon H3 N-Termini binden, und deren Bindungsfähigkeit durch die R2 Dimethylierung und die R27 Trimethylierung positiv beeinflusst werden. Bei MBD3 wurde vermutet, dass dessen Affinität zu Histon H3 N-Termini durch eine Dimethylierung am R2 vermindert wird.

4.2.1.3 Verifizierung der identifizierten Histon-Bindungsproteine durch Immundetektion

Die Histonbindung des SET Proteins wurde in unserer Arbeitsgruppe bereits untersucht (Wagner et al. 2006). Die durch die Massenspektroskopie neu gefundenen Bindungsproteine MBD3 und Nucleophosmin sollten nun in der Immundetektion in ihrem Bindungsverhalten überprüft werden. Dazu wurden die Pulldown-Experimente mit denselben Bedingungen wiederholt. Nach der Auftrennung durch die Gelelektrophorese allerdings wurden die gebundenen Proteine auf PVDF-Membran transferiert (s. 3.3.7) und mit entsprechenden Antikörpern sichtbar gemacht (s. 3.3.10). Dies erlaubte die direkte Beobachtung der einzelnen Proteine und ihrer Mengen in den jeweiligen Pulldown-Bedingungen. Dabei wurde zuerst das Protein MBD3 untersucht, da dieses das auffälligste Bindungsmuster in Abhängigkeit der R2-Methylierung zeigte. Dazu wurde einerseits ein HA-getaggtetes MBD3 Konstrukt (s. 2.3) in HEK293 Zellen transfiziert (s. 3.1.3) um eine Überexpression mit dem zu detektierenden HA-Tag zu erhalten. Aus diesen Zellen wurde Gesamtzellextrakt hergestellt (s. 3.3.16) und dieser für den Pulldown eingesetzt. Zum zweiten wurde aus NT2/D1 Zellen ebenfalls Gesamtzellextrakt nach 3.3.16 präpariert und im Pulldown verwendet. Das Pulldown-Experiment verlief wie schon zuvor nach Vorschrift (s. 3.3.26). Nach erfolgreichem Transfer auf PVDF-Membran wurde das gebundene MBD3 entweder mit HA-Antikörper oder mit spezifischem MBD3-Antikörper detektiert.

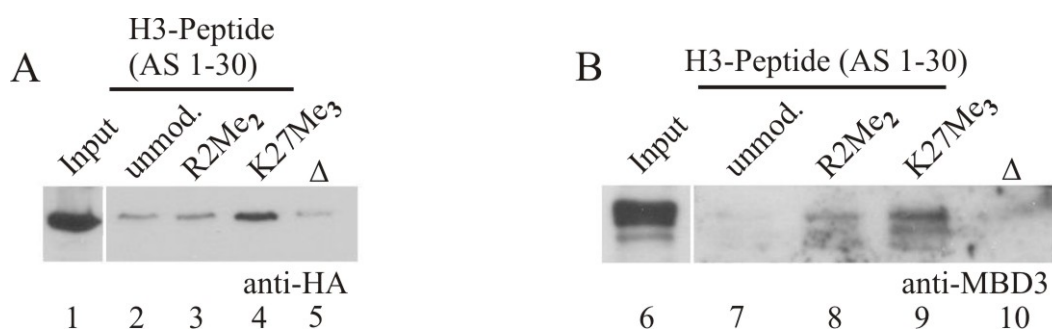


Abbildung 4.16: Überexprimiertes HA-MBD3 (A) bzw. endogenes MBD3 (B) zeigt keine präferentielle Histonbindung

Immundetektion von MBD3 im Peptid-Pulldown. 150 µg HA-MBD3 Extrakt aus HEK293 Zellen bzw. 150 µg NT2/D1 Gesamtzellextrakt wurden mit je 20 µl Sulfolink-Gel mit 10 µg gekoppeltem Histon H3-Peptid (AS 1-30) für 15 min bei 4°C inkubiert (s. 3.3.26). Das Sulfolink-Gel wurde 8mal mit IPH-Puffer gewaschen, auf ein 10%iges Gel aufgetragen und auf PVDF-Membran transferiert. Die Detektion der Proteine erfolgte nach 3.3.10 mit HA-Antikörper (A) bzw. MBD3-Antikörper (B) (s. 2.5). Im Input wurden 10% des Extrakts aufgetragen. Δ: Leerkontrolle ohne Peptid.

In **Abbildung 4.16** sind die Immundetektionen der beiden Pulldowns aufgeführt. Zu erwarten gewesen wäre bei beiden Experimenten für das R2Me₂-Peptid eine MBD3 Bande, die im Vergleich zu den unmodifizierten bzw. K27 trimethylierten Peptiden schwächer erscheint, wie in den vorangehenden Silberfärbungen gesehen (Bande ** in **Abbildung 4.13**, **Abbildung 4.14** und **Abbildung 4.15**). Zu erkennen war allerdings, dass für das überexprimierte HA-MBD3 in **Abbildung 4.16 A** die Bandenstärke zwischen unmodifiziertem (Spur 2) und R2Me₂-Peptid (Spur 3) nicht variierte und in Spur 4, dem K27Me₃-Peptid stärker wurde. Das Signal des endogenen MBD3 (**Abbildung 4.16 B**) dagegen nahm vom unmod. Peptid (Spur 7) über das dimethylierte R2 (Spur 8) zum trimethylierten K27 Peptid (Spur 9) an Intensität zu. Diese Experimente wurden noch einige Male wiederholt, wobei sich aber niemals das in der Silberfärbung gefundene Bindungsmuster für MBD3 einstellte.

Das Bindungsmuster von Nucleophosmin sollte ebenfalls durch Immundetektion überprüft werden. In der Silberfärbung zeigte die als Nucleophosmin identifizierte Bande eine Zunahme ihrer Intensität vom unmodifizierten Histon H3-Peptid über das R2Me₂- hin zum K27Me₃-Peptid (s. **Abbildung 4.13** Bande *). Zur Bestätigung im Western Blot wurde mit NT2/D1 Gesamtzellextrakt ein Pulldown durchgeführt und die Anwesenheit von Nucleophosmin mit einem spezifischen Antikörper nachgewiesen.

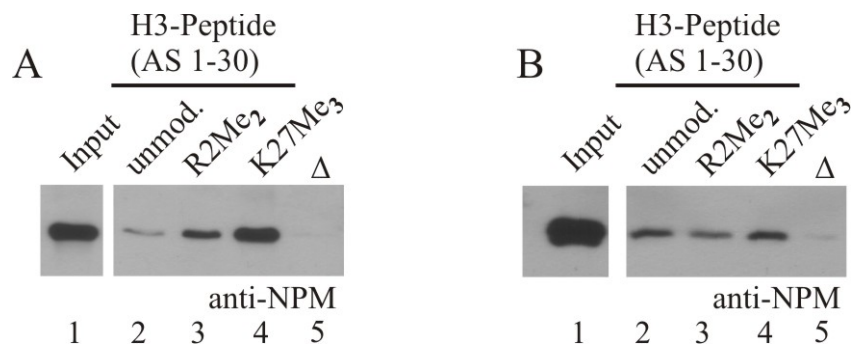


Abbildung 4.17: Nucleophosmin zeigt keine eindeutiges Histonbindungsmuster

Immundetektion von Nucleophosmin im Peptid-Pulldown. 100 µg (A) bzw. 150 µg (B) Gesamtzellextrakt aus NT2/D1 Zellen wurden mit je 20 µl Sulfolink-Gel mit 10 µg gekoppeltem Histon H3-Peptid (AS 1-30) für 15 min bei 4°C inkubiert (s. 3.3.26). Das Sulfolink-Gel wurde 8mal mit IPH-Puffer gewaschen, auf ein 10%iges Gel aufgetragen und auf PVDF-Membran transferiert. Die Detektion der Proteine erfolgte nach 3.3.10 mit anti-NPM Antikörper (s. 2.5). Im Input wurden 10% des Extrakts aufgetragen. Δ: Leerkontrolle ohne Peptid.

Wie **Abbildung 4.17 A** veranschaulicht trat zunächst das erwartete Bindungsmuster für Nucleophosmin auf. Die Stärke der Bindung ist beim unmodifizierten H3-Peptid am

geringsten (Spur 2), nimmt beim R2 dimethylierten Peptid zu (Spur 3) und ist am stärksten beim K27 trimethylierten Peptid (Spur 4). Bei der Wiederholung dieses Experiments zeigte sich allerdings ein unterschiedliches Bild (s. **Abbildung 4.17 B**). Hier war die Intensität der Nucleophosminbande bei allen Peptiden ungefähr gleich stark, lediglich am R2Me₂-Peptid etwas geringer. Bei weiteren Wiederholungen des Nucleophosmin-Pulldowns (nicht gezeigte Daten) konnte kein einheitliches Bindungsmuster für Nucleophosmin in der Immundetektion gefunden werden. Wie auch für MBD3 konnten die Ergebnisse der Silberfärbungen in der spezifischen Identifikation im Western Blot nicht verifiziert werden.

Es muss davon ausgegangen werden, dass das in der Silberfärbung beobachtete Bindungsverhalten lediglich ein Effekt dieser Färbung war, bei dem durch Überlagerung unspezifisch bindender Proteine ein scheinbar differentielles Muster erzeugt wurde. Zusammenfassend zeigten weder MBD3, noch Nucleophosmin in der Immundetektion eine eindeutige Abhängigkeit ihrer Histon H3-Bindungsfähigkeit von Modifikationen an R2 oder K27.

4.2.2 Untersuchung eines möglichen Zusammenhangs zwischen Methylierungen an H3R2 und H3K27

Da die unvoreingenommene Suche nach Bindungspartnern von dimethyliertem R2 in Histon H3 durch Peptid-Pulldowns aus einfachen Zellextrakten zu keinem zufriedenstellenden Ergebnis geführt hat, sollte nun eine direktere Vorgehensweise angewandt werden. Es sollte überprüft werden, ob ein möglicher Zusammenhang zwischen R2 und R27 Methylierung auf Basis der Histonbindung der entsprechenden Enzyme existiert.

Die Hinweise darauf stammten einerseits aus den Microarraydaten von (Guccione et al. 2006), die beide Modifikationen an denselben Promotoren zeigen, wie auch aus den Methylierungspräferenzen von PRMT6 bezüglich K27-trimethylierten H3-Peptiden (s. 4.1.4) der vorliegenden Arbeit. In den folgenden Experimenten sollten deshalb untersucht werden ob eine Modifikation zur Bindung des für die andere Markierung verantwortlichen Enzyms führt.

4.2.2.1 Untersuchung der Histonbindungseigenschaften der *Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2) Komponenten*

Die Trimethylierung an K27 in Histon H3 wird von dem Enzymkomplex Polycomb Repressive Complex 2 katalysiert (s. 1.2.5). In Säugerzellen besteht dieser aus den Kernkomponenten: *Enhancer of Zeste* (EZH), *Embryonic ectoderm development* (EED), *Supressor of Zeste 12* (SUZ12) und dem *RB-associated protein 46/48* (RbAp46/48). Es sollte nun geklärt werden ob eine dieser Komponenten Histonbindungseigenschaften besitzt, die durch eine vorliegende Dimethylierung an R2 verstärkt werden, und somit die Bindung des gesamten PRC2 – Komplexes ermöglicht. Dies wurde wiederum durch Pulldown-Experimente untersucht. Die PRC2 – Komponenten Ezh2, Eed3 bzw. Suz12 wurden als Flag-Konstrukte in HEK293 Zellen überexprimiert, wohingegen die Komponente RbAp46 endogen aus NT2/D1 Zellen nachgewiesen wurde. Von diesen Zellen wurden Extrakte nach 3.3.16 hergestellt und für das Experiment eingesetzt. Als Peptide wurden die schon zuvor verwendeten Histon H3 Peptide (unmod., R2Me₂ und K27Me₃) eingesetzt. Die Pulldown Western-Blots der vier PRC2-Kernkomponenten sind in **Abbildung 4.18** dargestellt.

Für Ezh2 (**Abbildung 4.18A**) wurde eine sehr schwache Bindung des Proteins an die Histonpeptide gefunden, dabei allerdings keine Präferenz für eine der Modifikationen. Bei Eed3 (**Abbildung 4.18 B**) und Suz12 (**Abbildung 4.18 C**) war kein Signal bei den Peptiden sichtbar, was gegen die Fähigkeit dieser Proteine spricht an Histon H3 Peptide binden zu können. Einzig bei RbAp46 (**Abbildung 4.18 D**) konnte eine Bande beim K27Me₃-Peptid ausgemacht werden, die bedeuten würde, dass RbAp46 an die Modifikation bindet, welche vom PRC2-Komplex selbst gesetzt wird. Es war aber keine Interaktion einer dieser Komponenten mit dem R2Me₂-Peptid zu detektieren. Für keine der PRC2-Komponenten konnte eine erhöhte Bindungsaffinität zu dimethyliertem R2 in Histon H3 nachgewiesen werden.

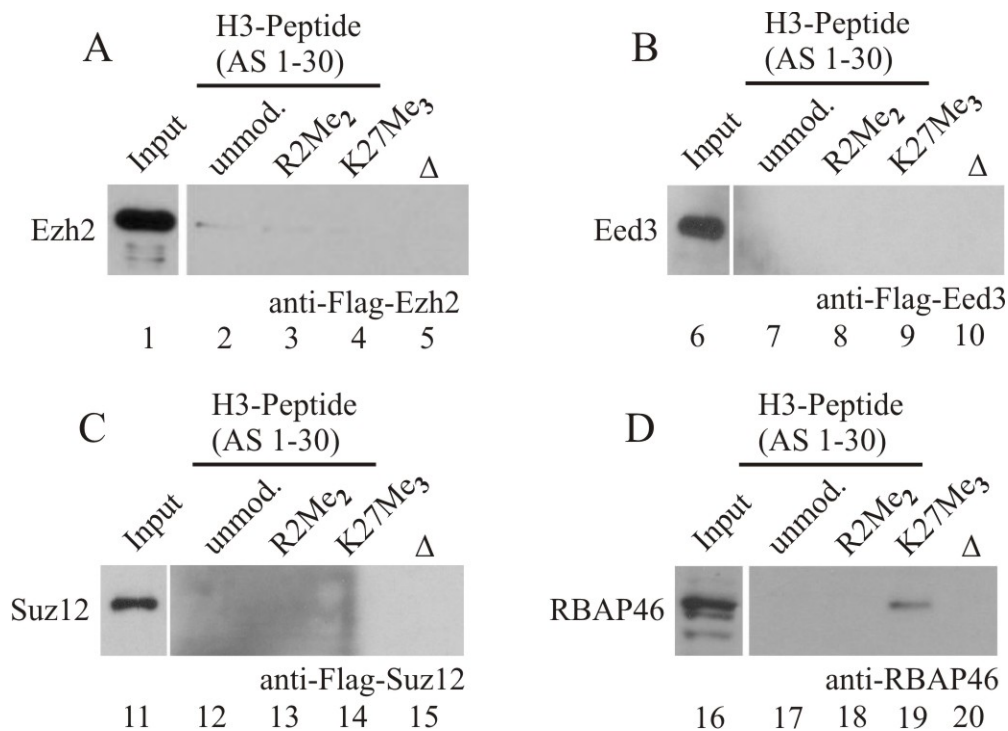


Abbildung 4.18: Die PRC2-Komponenten Ezh2 (A), Eed3 (B), Suz12 (C); RBAP46 (D) besitzen keine erhöhte Bindungsaffinität zu dimethyliertem R2 in Histon H3

Immundetektion der PRC2-Komponenten im Peptid-Pulldown. 150µg Flag-Ezh2 (A), Flag-Eed3 (B) oder Flag-Suz12 (C) Extrakt aus HEK293 Zellen bzw. 150µg NT2/D1 Gesamtzellextrakt (D) wurden mit je 20µl Sulfolink-Gel mit 10µg gekoppeltem Histon H3-Peptid (AS 1-30) für 15 min bei 4°C inkubiert (s. 3.3.26). Das Sulfolink-Gel wurde 8mal mit IPH-Puffer gewaschen, auf ein 10%iges Gel aufgetragen und auf PVDF-Membran transferiert. Die Detektion der Proteine erfolgte nach 3.3.10 mit Flag-Antikörper (A,B,C) bzw. RbAp46-Antikörper (D) (s. 2.5). Im Input wurden 10% des Extrakts aufgetragen. Δ: Leerkontrolle ohne Peptid.

4.2.2.2 Untersuchung der Histonbindungseigenschaften der Protein Arginin Methyltransferase 6

Da gezeigt wurde, dass die PRC2-Komponenten nicht durch dimethyliertes R2 an das Histon H3 gebunden werden, sollte nun im Umkehrschluss überprüft werden, ob PRMT6 ein erhöhtes Bindungsbestreben zu an K27 trimethyliertem Histon H3 aufweist. Dies wurde abermals mit Hilfe von Pulldown-Experimenten untersucht, für die endogenes PRMT6 aus MCF-7 Zellextrakten bzw. überexprimiertes TAP-PRMT6 aus stabilen MCF-7 Zellklonen verwendet wurde. Diese Extrakte wurden mit den zuvor benutzten Peptiden inkubiert. Im Fall der TAP-PRMT6 wurden zusätzlich die jeweils monomethylierten R2 bzw. dimethylierten K27 H3-Peptide hinzugenommen. Die Anwesenheit von PRMT6 wurde mittels eines spezifischen Antikörpers (anti-PRMT6

C-term.; s. 2.5) gegen PRMT6 nachgewiesen. Das Resultat dieses Pulldown-Experiments zeigt **Abbildung 4.19**.

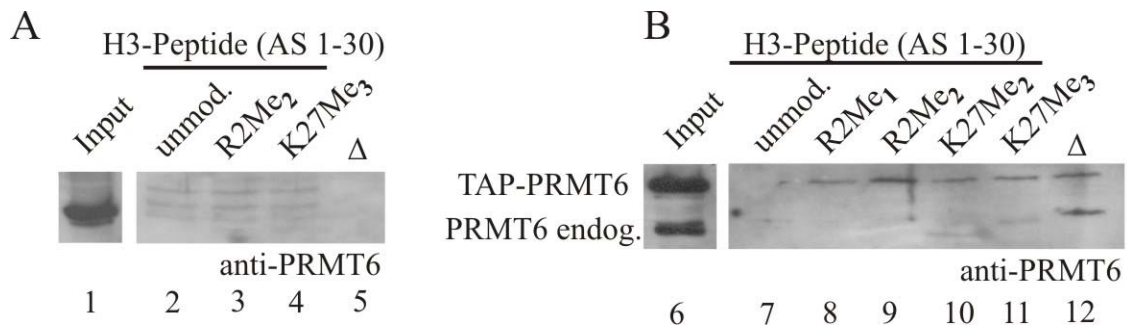


Abbildung 4.19: Endogenes PRMT6 (A) wie auch überexprimiertes TAP-PRMT6 (B) zeigen keine Bindung an Histon N-Termini

Immundetektion. 200µg MCF-7 WT (A) bzw. MCF-7 PRMT6 fl (B) Gesamtzellextrakt wurden mit je 20µl Sulfolink-Gel mit 10µg gekoppeltem Histon H3-Peptid (AS 1-30) für 15 min bei 4°C inkubiert (s. 3.3.26). Das Sulfolink-Gel wurde 8mal mit IPH-Puffer gewaschen, auf ein 10%iges Gel aufgetragen und auf PVDF-Membran transferiert. Die Detektion der Proteine erfolgte nach 3.3.10 mit PRMT6 C-term. Antikörper (s. 2.5). Im Input wurden 10% des Extrakts aufgetragen. Δ: Leerkontrolle ohne Peptid.

Betrachtete man das Experiment mit dem endogenem PRMT6 (**Abbildung 4.19 A**), so war keine Histonbindungsfähigkeit von PRMT6 zu erkennen. Bei keinem der drei Peptide (Spuren 2 -4) konnte eine Proteinbande auf Höhe von PRMT6 (siehe Input; Spur1) ausgemacht werden. Lediglich schwache Hintergrundbanden waren zu erkennen. Auch im Falle des überexprimierten TAP-PRMT6 (**Abbildung 4.19 B**) war keine präferentielle Histonbindung vorhanden. In diesem Experiment waren sowohl endogenes PRMT6 wie auch TAP-PRMT6 zu sehen (siehe Input; Spur 6). Endogenes PRMT6 zeigte wie schon zuvor keine Bindung an die Peptide. Das überexprimierte TAP-PRMT6 war zwar als Bande in den Peptidspuren zu sehen, es konnte aber keine bevorzugte Bindung mit einem der Peptide beobachtet werden. Einzig in Spur 9 war das Signal etwas stärker, das für das R2Me₂-Peptid stände. Bei Betrachtung der Bindung der beiden PRMT6 an das Sulfolink-Gel (Δ; Spur 12) erfolgte der Schluss, dass keine der beobachteten Bindungssignale über Hintergrundstärke waren. Man kann also auch im Falle der PRMT6 sagen, dass dieses keine Histonbindungsfähigkeit besitzt und dementsprechend auch keine Präferenz für trimethyliertes K27 besäße.

Ein positiver Zusammenhang bzw. eine gegenseitige Beeinflussung von R2 Dimethylierung und K27 Trimethylierung konnte mit den in dieser Arbeit verwendeten Methoden nicht nachgewiesen werden. Zumindest nicht auf Ebene der *in vitro*

Enzymbindung durch die Modifikationen an die Histon N-Termini. Allerdings wurden in der vorliegenden Arbeit auch nicht alle Möglichkeiten einer positiven Einflussnahme von PRMT6 bzw. R2Me₂ auf den PRC-Komplex (K27Me₃) oder umgekehrt untersucht.

4.3 Die Rolle der Arginin 2 Dimethylierung im Histon-Code: Effekte auf die Trimethylierung des Lysin 4 in Histon H3

Neben dem gemeinsamen Auftreten der R2 Dimethylierung zusammen mit repressiven Modifikationen wie beispielsweise K27Me₃, war ein weiteres Ergebnis der Microarraystudien von (Guccione et al. 2006), dass sich an bestimmten c-Myc Zielgenpromotoren die Dimethylierung am R2 mit der Trimethylierung an K4 gegenseitig ausschließen. Zwischen diesen beiden Markierungen in Histon H3, R2Me₂ und K4Me₃, könnte demnach eine potentielle negative Einflussnahme untereinander vorliegen. Ein zusätzlicher Hinweis auf einen gegenseitigen negativen Effekt dieser Modifikationen wurde auch in der vorliegenden Arbeit bei der Inhibition der PRMT6 Methyltransferaseaktivität durch die Trimethylierung des K4 (s. 4.1.4) gefunden.

Die K4 Trimethylierung in Histon H3 ist eine aktivierende Markierung. Sie tritt ausschließlich an transkribierten Genpromotoren auf und führt dort durch Rekrutierung von Chromatin Remodelern oder Transkriptionfaktoren zur Genexpression (s. 1.2.4). Für die von PRMT6 katalysierte R2 Dimethylierung wurden soweit nur Hinweise auf eine repressive Rolle im Histoncode gefunden: die Koexistenz mit repressiven Markierungen (H3K27Me₃) und der Ausschluss mit aktiven Markierungen wie H3K4Me₃. Falls die R2 Methylierung eine repressive Funktion durch einen negativen Effekt auf die Trimethylierung des K4 ausübt, sollte dies zu einer Reduktion der K4Me₃ Mengen führen. Eine verminderte K4 Methylierung des jeweiligen Promotors würde eine erniedrigte Transkription der betreffenden Gene zur Folge haben. Um diese negative Genregulation für PRMT6 zu bestätigen, wurde in den folgenden Experimenten nach repressiven Effekten der PRMT6-vermittelten R2 Methylierung auf die Genexpression gesucht.

4.3.1 Untersuchung der von Lysin 4 regulierten c-Myc Genexpression

Eine Möglichkeit um die vermutete Repression von K4Me₃ regulierten Genen durch die R2 Dimethylierung nachzuweisen, war die Verwendung des Modellsystems der APC-reprimierten c-Myc Genexpression. Dabei wurde die Regulation der Expression des Gens c-Myc durch den Tumorsuppressor *adenomatous polyposis coli* (APC) im Zusammenhang des Wnt-Signalweg untersucht (s. 1.2.4). Das Tumorsuppressorprotein APC ist Bestandteil der Degradationsmaschinerie, die zum Abbau des Coaktivators β -Catenin und somit zur Repression seiner Zielgene, z. B. c-Myc führt. (Sierra et al. 2006) konnten zeigen, dass diese APC-vermittelte Inaktivierung des Wnt-Signalwegs, neben der Repression, zur Reduktion der K4 Trimethylierung in den entsprechenden Promotorbereichen führt. Die Frage, die sich nun in der vorliegenden Arbeit ergab war, ob die von PRMT6 katalysierte R2 Dimethylierung bei dieser Reduktion der K4 Trimethylierung eine Rolle spielt.

4.3.1.1 Das Wnt-Signalweg Modellsystem der APC-induzierten c-Myc Repression

Um dieser Frage nachzugehen, wurde ein etabliertes Modellsystem verwendet, das eine induzierte APC-vermittelte Inaktivierung des Wnt-Signalwegs und somit eine Repression des Zielgens c-Myc erlaubt. Dazu wurden HT-29 Kolonkarzinomzellen (s. 2.1), die lediglich trunkiertes, inaktives APC besitzen, mit einem stabil transfizierten volle Länge APC-Konstrukt versehen (He et al. 1998). Dieses Konstrukt steht unter der Kontrolle eines Zink-abhängigen Metallothionein Promotors und kann somit durch Zinkchlorid-Behandlung der Zellen exprimiert werden. Die erhöhten Mengen an APC führten zur Degradation des β -Catenin und somit zur Repression der c-Myc Genexpression (Sierra et al. 2006). Als Kontrollzellen wurden HT-29 Zellen verwendet, die ein β -Galactosidase exprimierenden Vektor trugen.

Um die induzierte APC-Expression in den HT-29 Zellen zu überprüfen, wurden diese 24 Stunde vor Induktion ausgesät, um eine Konfluenz von ca. 20% erreichen. Diese Zellen wurden dann zu den gewünschten Zeitpunkten mit Zinkchlorid behandelt (s. 3.1.5). Die Zellen wurden anschließend zur Proteinuntersuchung (s. 3.3.15) oder zur Quantifizierung der mRNA-Mengen (s. 3.2.6) mittels Reverser Transkriptase-Reaktion geerntet (s. 3.2.7). Zum Nachweis der erfolgreichen APC-Induktion wurden von den einzelnen Zeitpunkten Proteinprobe auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen und durch Immundetektion mit einem spezifischen APC-Antikörper (s. 2.5) untersucht. Die

Ergebnisse

Repression des c-Myc Gens wurde durch qPCR (s. 3.2.8) der durch die Reverse Transkriptase-Reaktion erhaltenen cDNA mit spezifischen c-Myc Primern (s. 2.6.1) nachgewiesen. Die Ergebnisse beider Experimente sind in **Abbildung 4.20** aufgeführt.

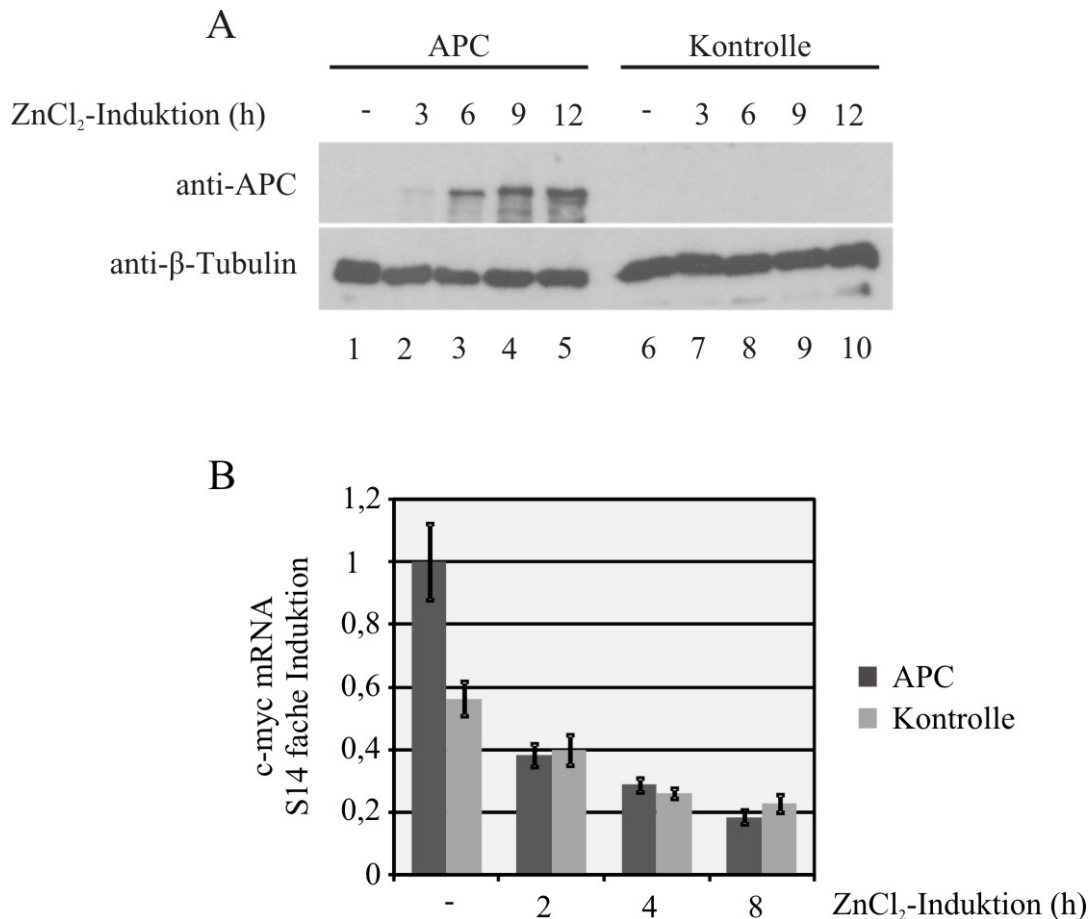


Abbildung 4.20: Zinkchlorid vermittelte Induktion des APC (A) in HT-29 Zellen und Repression des c-Myc Gens (B)

HT-29 APC Zellen bzw. HT-29 β-Galactosidase Kontrollzellen wurden für die angegebenen Zeitpunkte mit 200μM Zinkchlorid induziert (s. 3.1.5). (A) Immundetektion der APC-Proteinexpression. Für die Proteinuntersuchung wurde aus den Zellen Gesamtzellextrakt (s. 3.3.15) hergestellt, dieser einer Gelelektrophorese (s. 3.3.3) unterzogen, die Proteine auf PVDF-Membran transferiert (s. 3.3.7) und durch Immundetektion (s. 3.3.10) mit Antikörpern gegen APC bzw. β-Tubulin als Ladekontrolle sichtbar gemacht. (B) Quantitative PCR des c-Myc-Transkripts. Aus den HT-29 Zellen Gesamt-mRNA präpariert (s. 3.2.6) und aus dieser die cDNA (s. 3.2.7) synthetisiert. Diese diente zur Quantifizierung der mRNA mittels qPCR (s. 3.2.8), dabei fungierte S14 als Standardgen.

In **Abbildung 4.20 A** ist die Proteinanalyse der HT-29 Zellen dargestellt. Im Falle der HT29 APC Zellen (links) ist die Expression des APC Proteins schon nach 3 Stunden Zinkchlorid-Induktion (Spur 2) zu detektieren, nach 9 Stunden Zinkchlorid Induktion hat die APC Menge ihr Maximum erreicht. Die β-Galactosidase Kontrollzellen (rechts) dagegen zeigen keine Expression des Tumorsuppressors APC. **Abbildung 4.20 B** zeigt

die Transkriptmenge des c-Myc Gens relativ zum Standardgen S14 nach Zinkchlorid-Induktion der HT-29 Zellen. Dabei ist zu sehen, dass sowohl in den APC-Zellen wie auch in den Kontrollzellen, die c-Myc mRNA während der Zinkchlorid-Behandlung abnimmt. Allerdings ist die Reduktion des c-Myc Transkripts in den APC-Zellen deutlicher (von 1 auf 0,2 fache Induktion) als im Falle der Kontrollzellen (von 0,6 auf 0,2 fache Induktion). Daher wurde dieses Modellsystem als verwendbar betrachtet, um die Repression des c-Myc Gens im Zusammenhang der Wnt-Inaktivierung und der damit verbundenen Reduktion der K4 Trimethylierung an Histon H3 zu untersuchen.

4.3.1.2 Einfluss der PRMT6 auf die APC-vermittelte c-Myc Repression

Falls die durch PRMT6 katalysierte Dimethylierung an R2 einen negativen Einfluss auf die K4 Trimethylierung besitzt oder sie sogar verhindert, sollte dies im Falle einer RNAi vermittelten Reduktion der PRMT6 Proteinmenge nachzuweisen sein. Mit einer spezifischen siRNA gegen PRMT6 sollte die Menge dieses Enzyms reduziert werden. Spielte die PRMT6 in der Reduktion der K4 Trimethylierung während der c-Myc Repression eine entscheidende Rolle, so war zu erwarten, dass diese Repression von c-Myc nach RNAi vermittelter PRMT6-Depletion weniger stark wäre.

Dazu wurde zuerst die Reduktion der PRMT6 Proteinmenge durch RNA-Interferenz in HT-29 Zellen etabliert. Als optimales Transfektionsreagenz von siRNA in HT-29 Zellen erwies sich Dharmafect 1. Die HT-29 APC Zellen wurden nach 3.1.4 mit siRNA gegen PRMT6 transfiziert. Als Kontrolle wählte man eine siRNA gegen das Protein Luciferase, welches in Säugerzellen nicht vorkommt. Die Behandlung der Zellen dauerte 48 Stunden, danach wurden die Zellen geerntet und auf Protein- (s. 3.3.15) bzw. mRNA-Gehalt (s. 3.2.6) untersucht. In **Abbildung 4.21** ist das Resultat des siRNA-Experiments in HT-29 Zellen dargestellt.

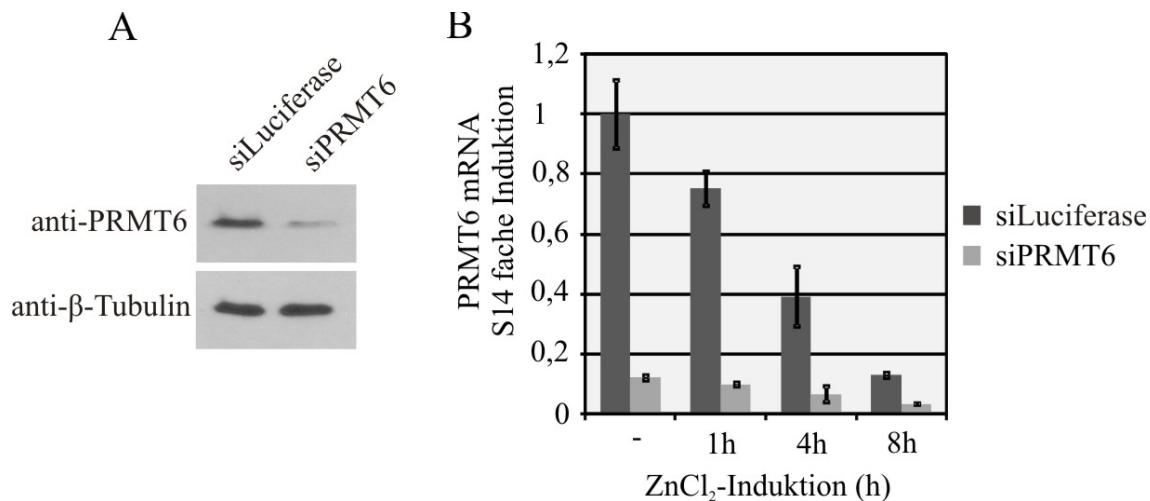


Abbildung 4.21: RNAi Depletion von PRMT6 Protein in HT-29 APC Zellen

HT-29APC Zellen wurden nach 3.1.4 mit siLuciferase (Kontrolle) bzw. siPRMT6 transfiziert und nach 48h geerntet. (A) Immundetektion des PRMT6-Proteins. Proteinmengen von PRMT6 bzw. β-Tubulin (Ladekontrolle) wurden durch Gelelektrophorese, Western-Blot und Immundetektion mit spezifischen Antikörpern (s. 2.5) untersucht. (B) RT-qPCR der PRMT6-mRNA. Zur Untersuchung der Transkriptmengen von PRMT6 während der Zinkchlorid-Induktion, induzierte man HT29-APC Zellen, welche mit siPRMT6/siLuciferase behandelt wurden für die angegebenen Zeitpunkte mit 200μM Zinkchlorid (s. 3.1.5) und erntete die Gesamt-RNA. Nach Herstellung der cDNA wurde mittels qPCR die PRMT6 mRNA-Menge bestimmt.

Der Einsatz von siPRMT6 führte zu einer drastischen Reduktion der PRMT6 Proteinmenge in den HT29-APC Zellen (**Abbildung 4.21 A**), während β-Tubulin unverändert blieb. Dies konnte parallel dazu in **Abbildung 4.21 B** auch auf mRNA-Ebene gezeigt werden. Die Menge an PRMT6-Transkript wurde im uninduzierten Fall um ca. 90% reduziert, verglichen mit der Kontrolle (siLuciferase). Überraschenderweise nahm die PRMT6 mRNA in der RNAi-Kontrolle (siLuciferase) mit andauernder ZnCl₂-Behandlung ab.

Um also einen Effekt der PRMT6 vermittelten R2 Methylierung auf die transkriptionelle Repression von c-Myc nachzuweisen, wurden die HT29-APC Zellen mit siRNA gegen PRMT6 bzw. Luciferase transfiziert und diese Zellen dann mit Zinkchlorid induziert. Nach der Induktion präparierte man aus den Zellen die Gesamt-RNA und ermittelte die Menge an c-Myc Transkript mittels qPCR. Die mRNA-Mengen von c-Myc sind in **Abbildung 4.22** dargestellt.

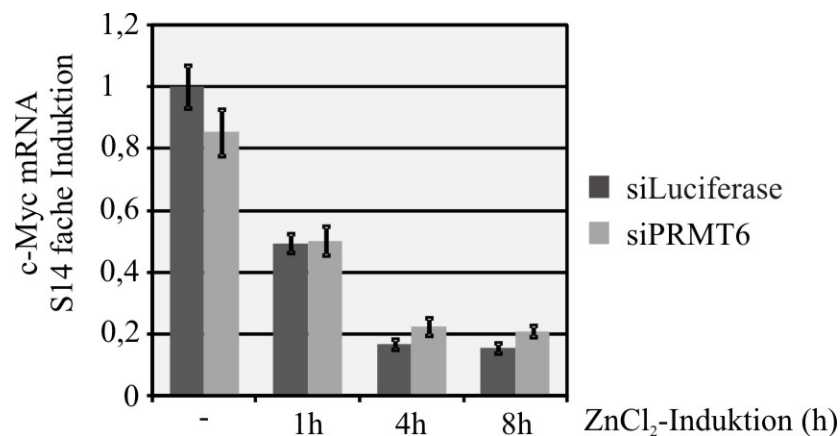


Abbildung 4.22: c-Myc Repression in HT-29 APC Zellen wird durch PRMT6 Depletion nicht beeinflusst

RT-qPCR der c-Myc Transkriptmenge nach PRMT6-Depletion. HT29-APC Zellen wurden nach 3.1.4 mit siLuciferase (Kontrolle) bzw. siPRMT6 transfiziert und anschließend die APC Expression mit 200 μ M Zinkchlorid induziert (s. 3.1.5). Nach den angegebenen Zeitpunkten wurde die Gesamt-RNA der Zellen geerntet und mittels RT-qPCR auf c-Myc mRNA Gehalt analysiert.

Hierbei war zu erkennen, dass die c-Myc Expression für beide Bedingungen, siPRMT6 wie auch die Kontrolle siLuciferase durch die Induktion von APC reprimiert wurde. Man konnte allerdings keinen Unterschied in dieser Repression zwischen den siPRMT6 und den siLuciferase behandelten HT-29 APC Zellen ausmachen.

Würde PRMT6 bei der Repression von c-Myc im Wnt-Signalweg eine Rolle spielen, wäre zu erwarten gewesen, dass bei Depletion der PRMT6 die Repression von c-Myc abgeschwächt wäre. Dieser fehlende Effekt spricht gegen einen Einfluss des PRMT6 auf den Inaktiverungsmechanismus des Wnt-Signalwegs.

4.3.2 Einfluss der Arginin 2 Dimethylierung auf den Lysin 4 Methyltransferasekomplex

Ein Effekt der von PRMT6 vermittelten R2 Dimethylierung auf die Repression des Wnt-Zielgens c-Myc konnte nicht nachgewiesen werden. Dies diente ursprünglich dem Zweck eine gegenseitige Beeinflussung der R2 und K4 Methylierung zu untersuchen. Es wurde daher eine direktere Herangehensweise gewählt, und nach einer unmittelbaren Beeinflussung des K4 Methyltransferasekomplexes (s. 1.2.4) durch die R2 Dimethylierung gesucht. Möglich erschien dabei eine direkte Inhibition der Aktivität des K4 Methyltransferasekomplexes oder aber das Verhindern einer Bindung desselben

an das Substrat, den Histon H3 N-Terminus. Diese beiden Möglichkeiten wurden im Folgenden näher untersucht.

4.3.2.1 Untersuchung der Aktivität von Lysin 4 Methyltransferasen in Abhängigkeit von der Arginin 2 Methylierung

In Abschnitt 4.1.4 der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass eine vorliegende Trimethylierung an K4 die *in vitro* Methyltransferaseaktivität des PRMT6 herabsetzt. Es stellte sich daher die Frage, ob dies auch umgekehrt der Fall ist, also ob die Dimethylierung an R2 die Enzymaktivität von K4 Methyltransferasen inhibiert. Um dies herauszufinden, wurden verschiedene K4 Methyltransferasen durch *in vitro* Methyltransferasereaktionen untersucht. Zum einen wurde die K4 Methyltransferase MLL1 untersucht, die für die Trimethylierung verantwortlich ist (s. 1.2.4). Als Kontrolle diente die K4 Monomethyltransferase Set7/9. Diese wurde als His-Set7/9-Fusionsprotein nach 3.3.13 in *E.coli* Bakterien exprimiert und aufgereinigt. Von MLL1 wurde nicht das komplette Enzym verwendet, sondern lediglich der C-terminale Teil des Enzyms (AS 3745-3969), welcher die enzymatisch aktive Set-Domäne enthält (Rozenblatt-Rosen et al. 1998). Dieses MLL1-Set Konstrukt wurde als GST-Fusionsprotein nach 3.3.12 in *E.coli* Bakterien exprimiert und aufgereinigt.

Diese beiden aufgereinigten Enzyme wurden für die *in vitro* Methyltransferasereaktionen eingesetzt. Als Substrate der Methylierung wurden wie schon für die Untersuchung der PRMT6 Methylierungspräferenz synthetisch vormodifizierte Histon H3-Peptide verwendet. Da der Methyltransfer anschließend im Szintillationszähler quantifiziert werden sollte, wurde als Methylgruppendonator das radioaktiv markierte ³H-S-Adenosyl-methionin eingesetzt. Nach erfolgter Reaktion wurde die Reaktionsmischung durch Gelelektrophorese (s. 3.3.3) aufgetrennt und auf PVDF-Membran transferiert (s. 3.3.7). Die zu messenden Peptide wurde mittels Ponceau-Färbung (s. 3.3.9) eingefärbt und deren Radioaktivität im Szintillationszähler (s. 3.3.22) analysiert. Das Ergebnis dieser Methyltransferaseuntersuchungen der His-Set7/9 bzw. der GST-MLL1-Set ist in **Abbildung 4.23** dargestellt.

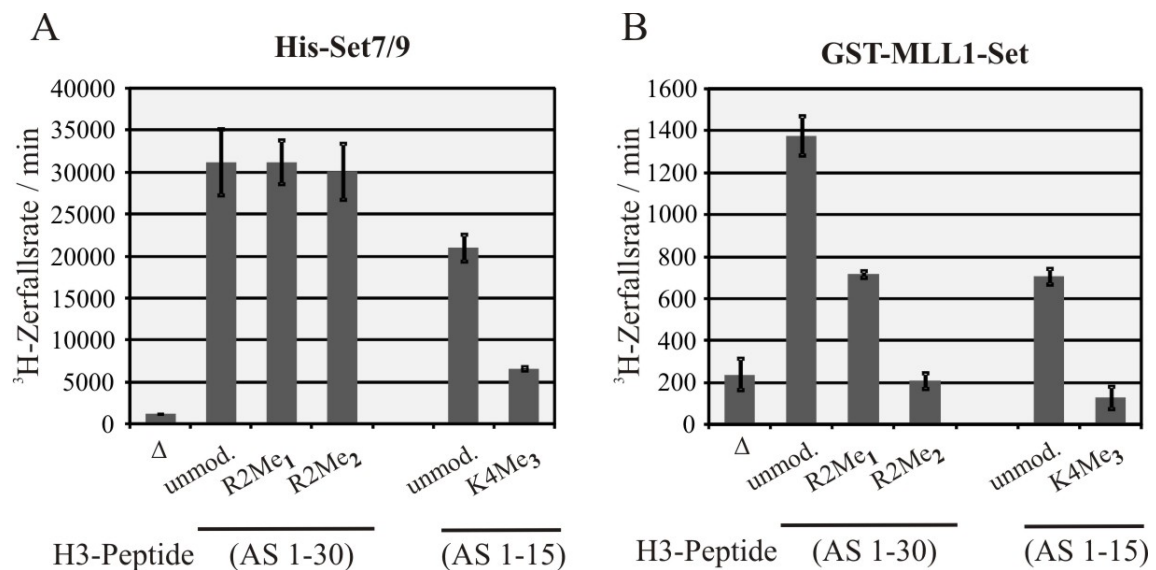


Abbildung 4.23: Methyltransferaseaktivität von MLL1-Set wird durch die R2 Dimethylierung vermindert

Szintillationsmessung der von His-Set7/9 (A) bzw. GST-MLL1-Set (B) methylierten Histon H3 Peptide. 1 μl der aufgereinigten His-Set7/9 (A) bzw. 20 μl der GST-MLL1-Set (B) wurden mit je 4 μg Histon H3-Peptid und 1 μl 3H-SAM für 2 bis 4 Stunden bei 30°C inkubiert (s. 3.3.20). Die Peptide wurden mit Gelelektrophorese aufgetrennt, auf PVDF-Membran transferiert, mit Ponceau-Färbung sichtbar gemacht und im Szintillationszähler vermessen (s. 3.3.22). Δ entspricht der Hintergrundmethylierung ohne Peptid.

In **Abbildung 4.23 A** ist zu sehen, dass die Aktivität der His-Set7/9 K4 Methyltransferase durch eine vorliegende R2 Methylierung nicht verändert wurde. Weder beim dimethylierten noch beim monomethylierten H3-Peptid war ein signifikanter Unterschied zum unmodifizierten Peptid zu erkennen. Um die Spezifität der gezeigten Aktivitäten zu überprüfen, wurde auch ein K4 trimethyliertes Peptid als Negativkontrolle verwendet. Auf diesem Peptid zeigte Set7/9 nur eine geringe Aktivität über Hintergrund.

Abbildung 4.23 B zeigt die Aktivität der MLL1-Set Methyltransferase. Hier ist eine starke Abnahme der Methyltransferaseaktivität zu erkennen, sobald das R2 in irgendeiner Form methyliert vorliegt. Schon die Monomethylierung an R2 führt zu einer Verminderung der Aktivität von MLL1-Set um ca. 50%. Bei der Dimethylierung von R2 geht die MLL1-Set Aktivität sogar auf Hintergrundsniveau zurück. Auch hier konnte mit dem trimethylierten K4-Peptid die Spezifität der gemessenen Aktivität bestätigt werden.

Während die *in vitro* Aktivität der K4 Monomethyltransferase Set7/9 durch die Methylierung an R2 in Histon H3 nicht beeinflusst wird, konnte demonstriert werden,

dass die K4 Trimethyltransferase MLL1-Set ihre *in vitro* Aktivität bezüglich des Histon H3 Peptids gänzlich verliert, wenn das R2 dimethyliert ist.

4.3.2.2 Bindung der Lysin 4 Methyltransferase Komplexkomponenten an Histon H3 N-Termini

Eine weitere Möglichkeit wie sich die R2 Dimethylierung negativ auf die K4 Trimethylierung auswirken könnte, ist die Behinderung einer Bindung des K4 Methyltransferasekomplexes an den Histon H3 N-Terminus. Dieser besteht in seinen Kernkomponenten aus der eigentlichen Methyltransferase MLL/Set, dem WD40-Protein WDR5 sowie den beiden Proteinen Ash2L und RbBP5 (s. 1.2.4). Da dieser Komplex das Histon H3 binden muss, um die Trimethylierung des K4 zu katalysieren, bestand die Frage, ob dieser Bindungsvorgang durch eine R2 Methylierung beeinflusst wird.

Um dem nachzugehen, wurde wie in 4.2 auf die Methode des Peptid-Pulldowns zurückgegriffen. Es sollte zuerst untersucht werden, wie die Histonbindungseigenschaften der Methyltransferase MLL1 durch die R2 Methylierung verändert werden. Dazu wurde ein Flag-MLL1-HA Konstrukt (s. 2.3) in HEK293 Zellen transfiziert (s. 3.1.3). Aus diesen Zellen wurde Gesamtzellextrakt präpariert (s. 3.3.16) und dieser für das Pulldown-Experiment verwendet. Dabei ist zu beachten, dass das MLL-Protein proteolytisch gespalten wird und lediglich der C-terminale Teil (MLL C-term.) enthält die enzymatisch aktive Set-Domäne zur Katalyse der K4 Trimethylierung. Für das Pulldown-Experiment wurden das unmodifizierte sowie die beiden R2 (mono- bzw. di-) methylierten Histon H3 Peptide eingesetzt. Das Experiment wurde nach 3.3.26 durchgeführt. Dazu wurde der Flag-MLL-HA HEK293 Extrakt mit an Sulfolink-Gel gekoppeltem H3-Peptid für 15min inkubiert. Nach ausgiebigem Waschen des Sulfolink-Gels wurden die gebundenen Proteine durch Gelelektrophorese aufgetrennt und auf PVDF-Membran transferiert. Mittels Immundetektion mit einem spezifischen Antikörper gegen den C-terminalen Teil von MLL1 (s. 2.5) wurde die Anwesenheit dieses Proteins in den Pulldowns nachgewiesen.

Dies ist in **Abbildung 4.24** dargestellt. Das MLL1 C-term. Protein bindet deutlich über Hintergrund an das Histon H3-Peptid. Dabei ist allerdings keine Präferenz für eines der Peptide zu erkennen. Sowohl im Falle des mono- (Spur 3) wie auch des dimethylierten (Spur 4) R2 Peptids ist die Proteinbande des MLL1 C-term. so stark wie beim

unmodifizierten Peptid (Spur 2). MLL1 bindet also unabhängig von einer R2 Methylierung an das Histon H3 Peptid.

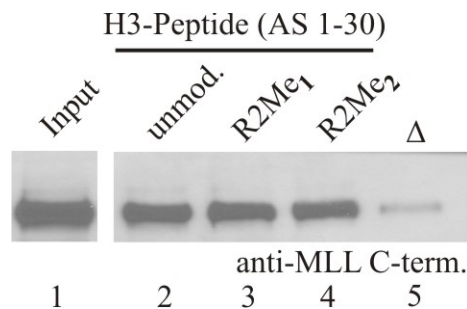


Abbildung 4.24: Die Histonbindung von MLL1 C-term. wird nicht von der R2 Methylierung beeinflusst

Immundetektion von MLL1 C-term. im Peptid-Pulldown. 100µg Flag-MLL1-HA HEK293 Gesamtzellextrakt wurde mit je 20µl Sulfolink-Gel mit 10µg gekoppeltem Histon H3-Peptid (AS 1-30) für 15 min bei 4°C inkubiert (s. 3.3.26). Das Sulfolink-Gel wurde 8mal mit IPH-Puffer gewaschen, auf ein 7,5%iges Gel aufgetragen und auf PVDF-Membran transferiert. Die Detektion des Proteins erfolgte mit Antikörper gegen den C-Terminus von MLL1 (s. 2.5). Im Input wurden 10% des Extrakts aufgetragen. Δ: Leerkontrolle ohne Peptid.

Da die Methyltransferase MLL1 in ihrer Histonbindung nicht von R2 beeinflusst wird, stellte sich die Frage, ob dies bei einer der anderen Komponenten der Fall ist. Vom WD40-Protein WDR5 ist bekannt, dass es in der Lage ist an Histon N-Termini zu binden. Im K4 Methyltransferasekomplex hat es vermutlich die Aufgabe an das Histonsubstrat zu koppeln und dessen Konformation so zu verändern, dass das K4 frei zugänglich für die Methyltransferase MLL wird.

Um die Histonbindungseigenschaften dieses Proteins zu untersuchen, wurde auch damit ein Peptid-Pulldown unternommen. Das WDR5 Protein wurde als Flag-Konstrukt (s. 2.3) in HEK293 Zellen transfiziert und daraus Gesamtzellextrakt hergestellt. Um das endogene WDR5 zu detektieren, wurde in einem zweiten Experiment Wildtyp-HEK293 Extrakt eingesetzt. Die Durchführung des Pulldown-Experiments entsprach der des C-terminalen MLL1. Die HEK293 Extrakte wurden mit dem H3-Peptidsäulenmaterial für 15min inkubiert und die Bindung der Proteine an die Peptide durch Immundetektion mit einem anti-Flag bzw. anti-WDR5 Antikörper sichtbar gemacht.

Abbildung 4.25 zeigt die Western-Blots dieser Experimente. Auch Flag-WDR5 besitzt eine hohe Bindungsaffinität zum N-Terminus des Histons H3, was am starken Signal beim unmodifizierten Peptid (Spur 2) im Vergleich zum Input (Spur 1) zu sehen war (s. **Abbildung 4.25 A**). Diese Affinität wurde durch ein monomethyliertes R2 kaum oder

nur gering vermindert (Spur 3). Allerdings ist im Falle des dimethylierten R2 (Spur 4) keine Bindung von Flag-WDR5 an das H3-Peptid zu erkennen. Auch das endogene WDR5 (s. **Abbildung 4.25 B**) zeigte dieses Muster. Am unmodifizierten Peptid war es gebunden (Spur 7), am R2 monomethylierten schwächer (Spur 8) und am dimethylierten R2 (Spur 9) konnte keine Bindung von WDR5 über Hintergrund ausgemacht werden.

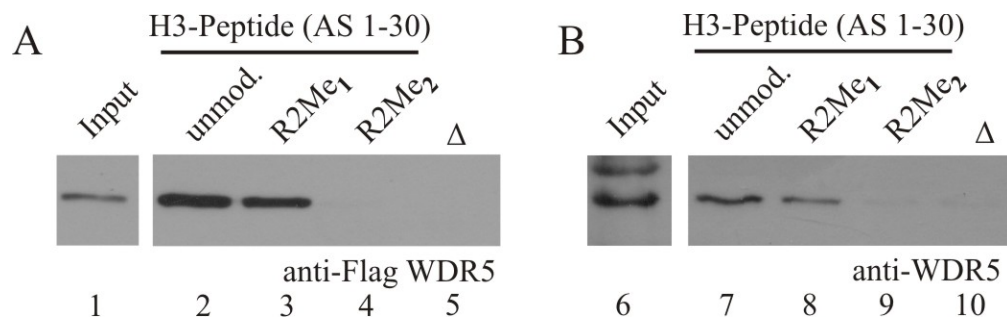


Abbildung 4.25: Flag-WDR5 (A) und endogenes WDR5 (B) bindet nicht an R2 dimethyliertes Histon H3 Peptid

Immunodetektion. 100µg Flag-WDR5 HEK293 Gesamtzellextrakt (A) bzw. HEK293 Gesamtzellextrakt (B) wurde mit je 20µl Sulfolink-Gel mit 10µg gekoppeltem Histon H3-Peptid (AS 1-30) für 15 min bei 4°C inkubiert (s. 3.3.26). Das Sulfolink-Gel wurde 8mal mit IPH-Puffer gewaschen, auf ein 10%iges Gel aufgetragen und auf PVDF-Membran transferiert. Die Detektion der Proteine erfolgte mit anti-Flag bzw. anti-WDR5 (Upstate) Antikörper (s. 2.5). Im Input wurden 10% des Extrakts aufgetragen. Δ: Leerkontrolle ohne Peptid.

Die Bindung der Komplexkomponente WDR5 an Histon H3 Peptide wird also von einer Dimethylierung am R2 inhibiert. Da WDR5 für die Funktion des K4 Trimethyltransferasekomplexes essentiell ist, wäre dies ein Hinweis auf einen möglichen negativen Einfluss der R2 Dimethylierung auf die K4 Trimethylierung.

4.3.2.3 Auswirkung der Arginin 2 Dimethylierung auf die Chromatinrekrutierung des Lysin 4 Methyltransferasekomplexes

Die *in vitro* Bindungsstudien in 4.3.2.2 haben gezeigt, dass WDR5, eine Komponente des K4 Methyltransferasekomplexes, die Affinität zum Histon H3 N-Terminus verliert, wenn R2 dimethyliert ist. Im Folgenden sollte daher untersucht werden, ob in diese Fall der gesamte Komplex nicht mehr an das Histon H3 binden kann. Der weitere Einsatz der Peptid-Pulldowns erschien für diese Fragestellung nicht mehr zweckmäßig. Die Untersuchung der Bindungsfähigkeit des Proteinkomplexes sollte unter Bedingungen

durchgeführt werden, welche der *in vivo* Situation in Säugerzellen entsprechen. Daher wurden Chromatin-Immunpräzipitationen (ChIP) durchgeführt (s. 3.3.27). Dabei wurden die zu untersuchenden Proteine mit spezifischen Antikörpern immunpräzipitiert. Die copräzipitierten Chromatinabschnitte, an denen die Proteine gebunden waren, wurden mittels qPCR identifiziert (s. 3.2.8). Um die unterschiedlichen Methylierungszustände des R2 am Histon H3 herzustellen, wurden für diese Experimente MCF-7 Zellklone (s. 2.1) verwendet, die einerseits PRMT6 bzw. ein Kontrollplasmid stabil überexprimierten. In den PRMT6 überexprimierenden Zellklonen war R2 verstärkt methyliert, während in den Kontrollzellen der Wildtyp Zustand vorlag (s. 4.1.2.3).

Um einen Effekt der R2 Dimethylierung auf die K4 Trimethylierung zu beobachten benötigte man ein Chromatinbereich, an dem die K4Me₃-Modifikation im Zuge der Genregulation vorkommt. Der Hox Genlokus ist dafür bekannt, dass die dort angesiedelten Gene durch die K4 Trimethylierung reguliert werden (s. 1.2.4). Durch RT-qPCR Untersuchungen konnte Claudia Stein nachweisen, dass die Transkriptmenge des HoxA2 Gens in den PRMT6-überexprimierenden MCF-7 Zellklonen im Vergleich zu den Kontrollzellen reduziert war (Hyllus et al. 2007). Die Expression des HoxA5 Gens erwies sich im Gegensatz dazu als unbeeinflusst. Damit wurde die Vermutung einer Genregulationsfunktion der PRMT6-vermittelten R2 Methylierung, in diesem Fall für HoxA2, bestätigt. Der potentielle negative Einfluss einer erhöhten R2 Dimethylierung auf die K4 Trimethylierung sollte an diesem Promotor untersucht werden.

Es wurden Chromatin-Immunpräzipitationen am HoxA2 Genlokus durchgeführt. Dabei wurde zwischen dem Promotorbereich (5'-Region) der untersuchten Gene sowie dem „*open reading frame*“-Bereich (3'-Region) unterschieden. Es wurden PRMT6 sowie die Histone, welche die R2Me₂- oder die K4Me₃-Modifikation in ihrem N-Terminus trugen präzipitiert. Um den Präzipitationshintergrund zu ermitteln, wurden Kaninchen IgG bzw. Kaninchen Präimmunserum als Kontrollantikörper eingesetzt. Die Zuweisung der gefundenen Proteine bzw. Modifikationen zu den bestimmten Chromatinbereichen im HoxA2 Locus wurde durch spezifische PCR-Primer erreicht. Die Auswertung einer solchen ChIP durch qPCR ist in **Abbildung 4.26** gezeigt.

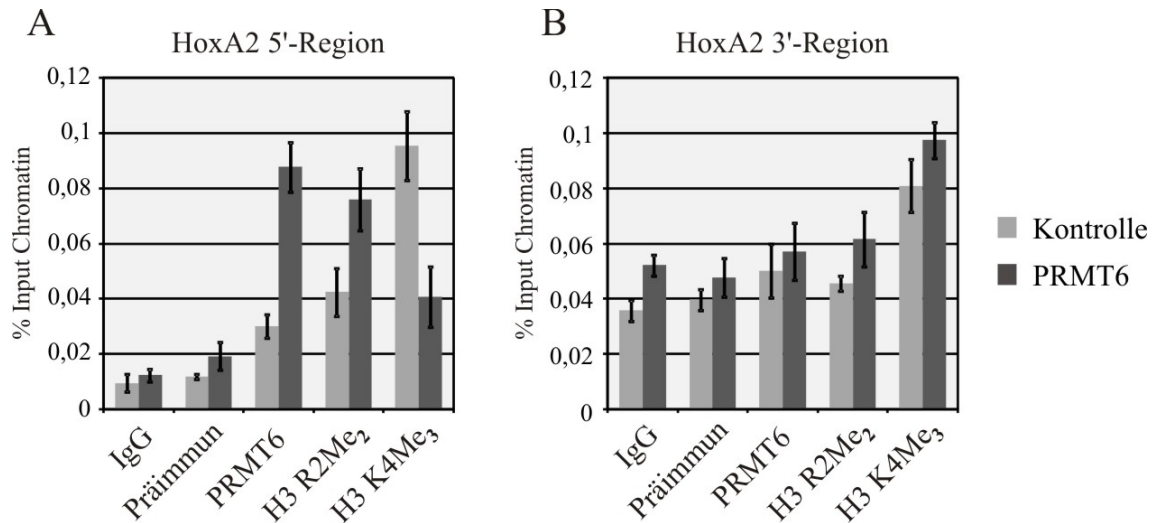


Abbildung 4.26: Chromatin-Immunpräzipitation von PRMT6, H3R2Me₂ und H3K4Me₃ am HoxA2 Lokus

qPCR-Auswertung der ChIP am HoxA2 Gen. PRMT6, H3R2Me₂ und H3K4Me₃ wurden mit spezifischen Antikörpern (s. 2.5) aus Chromatin von MCF-7 PRMT6 Zellklonen (#11) und MCF-7 Kontrollzellklonen (#5) präzipitiert. IgG aus Kaninchen sowie Kaninchen Präimmunsereum dienten als Kontrollantikörper. Die Chromatinbereiche wurden mit Primern für den Promotorbereich von HoxA2 (A; 5'-Region) oder für den 3'-Bereich von HoxA2 (B) identifiziert und als Prozentanteil des Input Chromatins angegeben.

Betrachtet man den Promotorbereich des HoxA2 Gens in **Abbildung 4.26 A**, ist zu erkennen, dass PRMT6 in den PRMT6-überexprimierenden MCF-7 Zellen verstärkt am Chromatin rekrutiert war, verglichen mit den Kontrollzellen. Die Dimethylierung an R2 wurde in den PRMT6-Zellen ebenfalls vermehrt gefunden. Im Gegensatz dazu fand man in den PRMT6 überexprimierenden Zellen weniger Trimethylierung an K4. Die Mengen an unspezifisch präzipitiertem Chromatin (IgG und Präimmun.) zeigten, dass die gefundenen Proteine bzw. Modifikationen deutlich über Hintergrund am Chromatin assoziiert waren.

Beim Vergleich mit dem 3'-Bereich des HoxA2 Gens in **Abbildung 4.26 B** wird deutlich, dass weder PRMT6 noch die R2 Dimethylierung hier verstärkt gefunden wurde. Sowohl in den Kontroll- wie auch den PRMT6-Zellklonen lagen die Signale von PRMT6 und H3R2Me₂ nicht über dem Hintergrund. Einzig die K4 Methylierung zeigte hier ein geringes Auftreten, wobei kein Unterschied zwischen PRMT6- und Kontrollzellen zu erkennen war.

Mittels dieser ChIP konnte gezeigt werden, dass eine verstärkte Rekrutierung der PRMT6 zu einer erhöhten R2 Dimethylierung führt und dies mit einer verminderten

Trimethylierung an K4 korreliert. Desweiteren sind diese Effekte auf den Promotorbereich des untersuchten Gens beschränkt.

Es sollte nun untersucht werden, ob die erhöhten R2Me₂-Mengen in den PRMT6 MCF7-Zellklonen zu einer verminderten Bindung bzw. Rekrutierung der K4 Methyltransferasekomponenten führen. Diese würde einen direkten Zusammenhang zwischen hohen R2Me₂ und niedrigen K4Me₃-Niveaus am Histon H3 erklären. Daher wurde das vorangehende ChIP-Experiment in den MCF7-Zellen wiederholt. Dieses Mal allerdings mit Antikörpern gegen den C- sowie den N-terminalen Teil der K4 Methyltransferase MLL1 und gegen das WD40 Protein WDR5. Die Rekrutierung dieser Proteine am Chromatin wurde wiederum im 5'- bzw. 3'- Bereich des HoxA2 Gens untersucht. **Abbildung 4.27** zeigt das Ergebnis dieser ChIP.

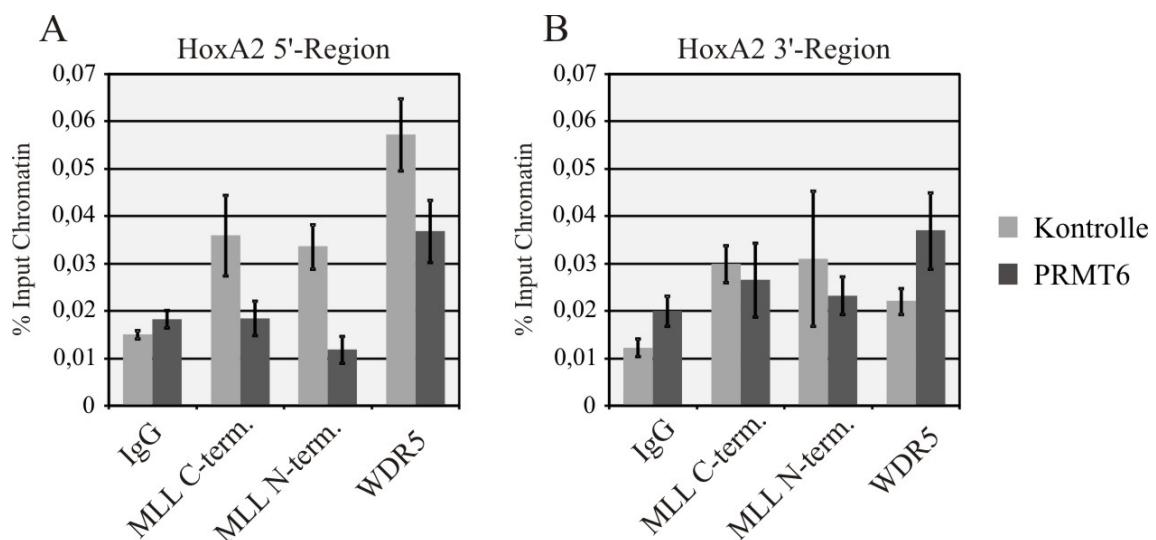


Abbildung 4.27: Chromatin-Immunpräzipitation von MLL und WDR5 am HoxA2 Lokus

qPCR-Auswertung der ChIP am HoxA2 Gen. WDR5 und der C- bzw. N-Terminus von MLL wurden mit spezifischen Antikörpern (s. 2.5) aus Chromatin von MCF-7 PRMT6 Zellklonen (#11) und MCF-7 Kontrollzellklonen (#5) präzipitiert. IgG aus Kaninchen diente als Kontrollantikörper. Die Chromatinbereiche wurden mit Primern für den Promotorbereich von HoxA2 (A; 5'-Region) oder für den 3'-Bereich von HoxA2 (B) identifiziert und als Prozentanteil des Input Chromatins angegeben.

Dabei ist für den Promotorbereich von HoxA2 zu erkennen, dass in den MCF-7 Kontrollzellen sowohl das C-terminale und auch das N-terminale MLL1 wie auch WDR5 über Hintergrund am Chromatin binden. Die Assoziation dieser Proteine mit dem Chromatin war im Falle der PRMT6 MCF-7 Zellen deutlich reduziert. Die Bindung von WDR5 ging um ca. 30% zurück, die von MLL fiel sogar unter das Hintergrundniveau. Betrachtet man dagegen den 3'-Bereich des HoxA2 Gens, erkennt man dort lediglich eine schwache Rekrutierung von MLL sowie von WDR5, welche nur

knapp über dem Hintergrund lag, sowie keine deutlichen Unterschiede zwischen PRMT6 und Kontroll MCF-7 Zellen.

Die Komponenten MLL und WDR5 des K4 Methyltransferasekomplexes sind also in den PRMT6 überexprimierenden MCF-7 Zellen schwächer mit dem Chromatin assoziiert. Dies korreliert mit den dort reduzierten K4Me₃-Mengen. Die verminderte Rekrutierung von MLL und WDR5 trat ebenfalls nur im HoxA2 Promotor und nicht im 3'-Bereich auf.

Im Folgenden sollte geklärt werden, ob diese Funktion von PRMT6 spezifisch für bestimmte Gene ist. Die vorangehenden Experimente zeigten, dass PRMT6 seinen Effekt lediglich im Promotorbereich des Gens HoxA2 ausübt. Nun sollte überprüft werden, ob dies auch bei anderen Genpromotoren des HoxA-Lokus der Fall ist. Das Gen HoxA5 zeigte sich in transkriptionellen Untersuchungen von der PRMT6 Überexpression unbeeinflusst. Dies lässt vermuten, dass PRMT6 dort nicht am Promotor sitzt und somit auch keinen Effekt auf Histonmodifikationen oder Chromatinrekrutierung ausübt. Um dies zu untersuchen, wurde am HoxA5 Promotor nach der Rekrutierung von PRMT6, den Histonmodifikationen an R2 und K4, sowie nach dem K4 Methyltransferasekomplex gesucht. Es wurden ChIP-Experimente mit den entsprechenden Antikörpern und den PCR-Primern für den HoxA5 Promotor durchgeführt.

In **Abbildung 4.28 A** ist die Rekrutierung der PRMT6 an diesen Abschnitt des HoxA5 Gens zu erkennen. PRMT6 war über Hintergrund am Chromatin assoziiert, zeigte aber keine Unterschied zwischen den PRMT6 überexprimierenden und den Kontrollzellen. Dementsprechend war die R2 Dimethylierung in beiden Zelltypen auf gleichem Niveau. In diesem Genbereich lag die R2Me₂ trotz anwesender PRMT6 nicht über Hintergrund. Die Trimethylierung des K4 trat dagegen in großem Mengen auf und wurde nicht durch die PRMT6 Überexpression beeinflusst.

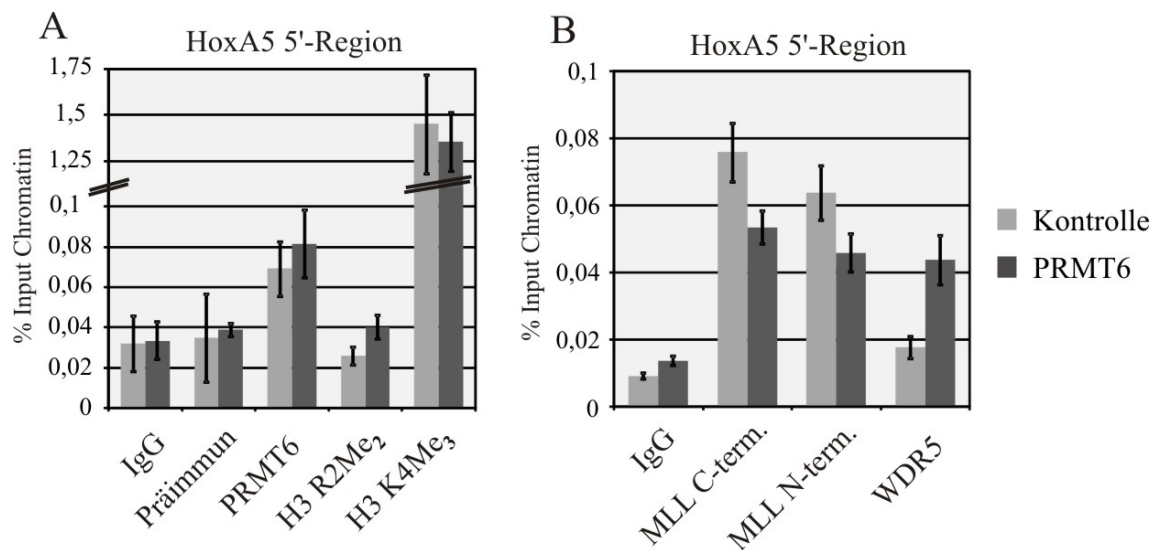


Abbildung 4.28: Chromatin-Immunpräzipitation von PRMT6, H3R2Me₂, H3K4Me₃, MLL und WDR5 am HoxA5 Promotor

qPCR-Auswertung der ChIP am HoxA5 Gen. PRMT6, H3R2Me₂, H3K4Me₃, WDR5 und der C- bzw. N-Terminus von MLL wurden mit spezifischen Antikörpern aus Chromatin von MCF-7 PRMT6 Zellklonen (#11) und MCF-7 Kontrollzellklonen (#5) präzipitiert. IgG aus Kaninchen sowie Kaninchen Präimmunsereum dienten als Kontrollantikörper. Der Chromatinbereich wurden mit Primern für den Promotorbereich von HoxA5 (5'-Region) identifiziert und als Prozentanteil des Input Chromatins angegeben.

Die Komponenten des K4 Methyltransferasekomplexes (s. **Abbildung 4.28 B**) waren am HoxA5 Promotor rekrutiert. Sie zeigten wie schon die K4Me₃ keine nennenswerte Beeinflussung in ihrer Assoziation durch die PRMT6 Überexpression. WDR5 war in den PRMT6 MCF-7 Zellklonen sogar verstärkt am Chromatin anwesend.

Diese ChIP-Experimente bestätigten, dass PRMT6 Überexpression zu einem erhöhten Vorkommen der R2 Dimethylierung führt und dass dies wiederum eine Verminderung der K4 Trimethylierung zur Folge hat. Die reduzierten K4Me₃-Mengen korrelierten mit einer verminderten Rekrutierung der K4 Methyltransferasekomponenten MLL und WDR5. Desweiteren konnte gezeigt werden, dass diese Effekte nur im Promotorbereich von bestimmten Genen auftreten.

4.3.2.4 Transkriptions- und Chromatineffekte der PRMT6 vermittelten Arginin 2 Dimethylierung während der neuronalen Differenzierung

Die in den MCF-7 Zellklonen gezeigten Chromatineffekte beruhten auf der Überexpression des PRMT6 und damit dem Anstieg der R2 Dimethylierung. Es sollte nun nach einem biologischen System gesucht werden, in welchem diese Regulation der

Histonmodifikationen nicht auf der reinen Überexpression der verantwortlichen Methyltransferase basiert.

Da die Trimethylierung des K4 eine Markierung für aktive Transkription darstellt, erwartet man bei einem Effekt auf diese Histonmodifikation ebenfalls eine veränderte Expression des entsprechenden Gens. Der Hox Genlokus unterliegt einer strengen Transkriptionsregulation während der Differenzierung von Zellen. Als Modell für die *in vivo* Genregulation durch PRMT6 wurde daher die neuronale Differenzierung der NT2/D1 Zellen gewählt. Diese können durch Induktion mit all-*trans*-Retinsäure (ATRA) zur Differenzierung gebracht werden. Dabei ändern sich spezifisch die Expressionen der verschiedenen Hox Gene, einige werden aktiviert, während andere reprimiert werden (Bracken et al. 2006).

Die Expression des schon zuvor untersuchten HoxA2 Gens während der Differenzierung der NT2/D1 Zellen ist in **Abbildung 4.29** aufgeführt. Dazu wurden NT2/D1 Zellen nach 3.1.6 differenziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde die Gesamt-RNA aus den Zellen isoliert (s. 3.2.6) und durch reverse Transkription (s. 3.2.7) sowie quantitativer PCR (s. 3.2.8) auf die HoxA2 Expression untersucht.

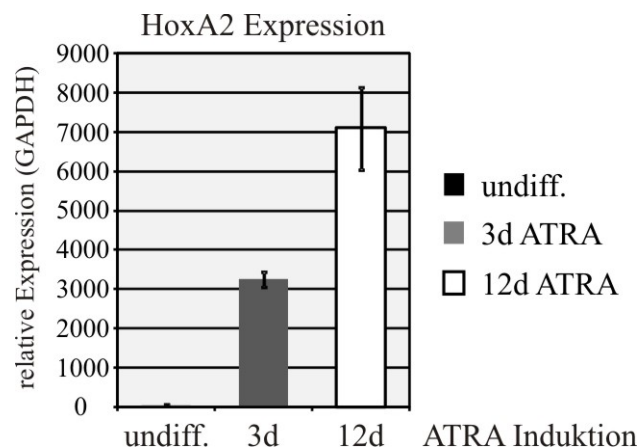


Abbildung 4.29: Expression von HoxA2 während der NT2/D1 Differenzierung

RT-qPCR der HoxA2 Transkriptmenge. NT2/D1 Zellen wurden nach 3.1.6 mit 1µM ATRA (all-*trans*-Retinsäure) differenziert. Nach den angegebenen Zeitpunkten wurde Gesamt-RNA präpariert, die entsprechende cDNA synthetisiert und die Expression von HoxA2 mittels qPCR bestimmt.

Die Expression der HoxA2 mRNA wird im Verlauf der Differenzierung der Zellen stark induziert. Nach 3 Tagen ist sie um den Faktor 3000 im Vergleich zu undifferenzierten Zellen, nach 12 Tagen sogar um das 7000fache erhöht.

Um nun die entsprechenden Chromatineffekte am HoxA2 Promotor sichtbar zu machen, wurden Chromatin-IPs durchgeführt. Die NT2/D1 Zellen wurden wiederum der Differenzierung mittels ATRA unterzogen. Aus dem gewonnenen Chromatin präzipitierte man PRMT6 sowie die beiden Histon H3 Modifikationen R2Me₂ und K4Me₃ mit entsprechenden Antikörpern. Die Anwesenheit dieser Proteine am Chromatin wurde durch qPCR am HoxA2 Promotor untersucht. Zu Kontrollzwecken wurde der Promotor des nicht beeinflussten Haushaltsgens GAPDH verwendet. Die Auswertung dieses Experiments ist in **Abbildung 4.30** dargestellt.

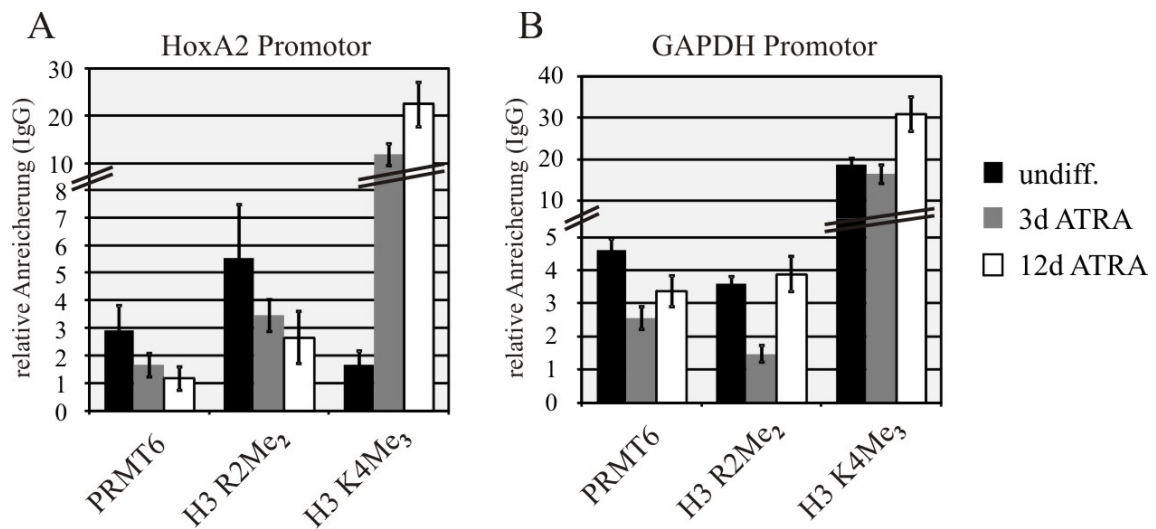


Abbildung 4.30: Rekrutierung von PRMT6, H3R2Me₂ und H3K4Me₃ am HoxA2 (A) bzw. GAPDH (B) Promotor während der NT2/D1 Differenzierung

qPCR-Auswertung der ChIP am HoxA2 bzw. GAPDH Promotor. NT2/D1 Zellen wurden nach 3.1.6 mit 1 μ M ATRA (all-*trans*-Retinsäure) differenziert. PRMT6, H3R2Me₂ und H3K4Me₃, wurden zu den angegebenen Zeitpunkten mit spezifischen Antikörpern aus Chromatin der NT2/D1 Zellen präzipitiert. IgG aus Kaninchen dienten als Kontrollantikörper. Der Chromatinbereich wurden mit Primern für den Promotorbereich von HoxA2 (5'-Region) (A) bzw. von GAPDH (B) identifiziert und als relative Anreicherung zum Kontrollantikörper IgG angegeben.

In **Abbildung 4.30 A** sind die Effekte am HoxA2 Promotor gezeigt. Die Anwesenheit des PRMT6 nahm im Verlauf der NT2/D1 Differenzierung stetig ab. Parallel dazu sanken auch die Werte für die Histon H3R2 Dimethylierung in diesem Genabschnitt. Die Trimethylierung an K4 dagegen stieg während der Differenzierung der Zellen stark an. Diese Effekte waren am GAPDH Promotor (s. **Abbildung 4.30 B**) nicht auszumachen. Die Werte dort zeigten weder die Abnahme der PRMT6 bzw. R2Me₂ Rekrutierung noch die Zunahme von K4Me₃.

Mit der neuronalen Differenzierung der NT2/D1 Zellen wurde ein biologisches System gefunden, in welchem die gegenseitige Beeinflussung von R2 und K4 Methylierung nachgewiesen werden konnte. Mit der transkriptionellen Aktivierung des HoxA2 Gens nimmt die Anwesenheit von trimethyliertem K4 am Promotor zu, während die von PRMT6 und dementsprechend auch die von dimethyliertem R2 abnimmt.

4.4 Herstellung eines polyklonalen PRMT6 Antikörpers

Für die zuvor gezeigten Experimente wurde zur Detektion der PRMT6 wie auch zur Immunpräzipitation derselben ein polyklonaler Kaninchen Antikörper verwendet. Dieser wurde mittels eines Peptids generiert welches aus dem C-Terminus der PRMT6 stammt. Um in nachfolgenden Studien bessere Ergebnisse bezüglich Präzipitations- bzw. Detektionseffizienz zu erreichen, sollte ein weiterer Antikörper hergestellt werden. Dieser wurde auch in Kaninchen, diesmal aber gegen die nahezu vollständige Sequenz des PRMT6 Protein generiert.

4.4.1 Generierung des polyklonalen PRMT6fl Antikörpers in Kaninchen

Zur Generierung des PRMT6fl (full length) Antikörpers wurden zwei Kaninchen verwendet, was zu zwei unterschiedlichen Antikörperseren (P6-1 und P6-2) führte. Als Antigen verwendete man ein pET His-PRMT6fl Konstrukt, welches aus den Aminosäuren 60 - 375 der PRMT6 bestand. Dieses Konstrukt wurde nach 3.3.14 in BL21 DE3 E.coli Bakterien exprimiert und unter denaturierenden (chaotropen) Bedingungen aufgereinigt. Die Aufreinigung unter nativen Bedingungen (s. 3.3.13) kam aufgrund geringer Proteinausbeuten und hoher Verunreinigung mit Fremdproteinen nicht in Frage. In **Abbildung 4.31** sind exemplarisch vier Präparationen des His-PRMT6fl Proteins dargestellt.

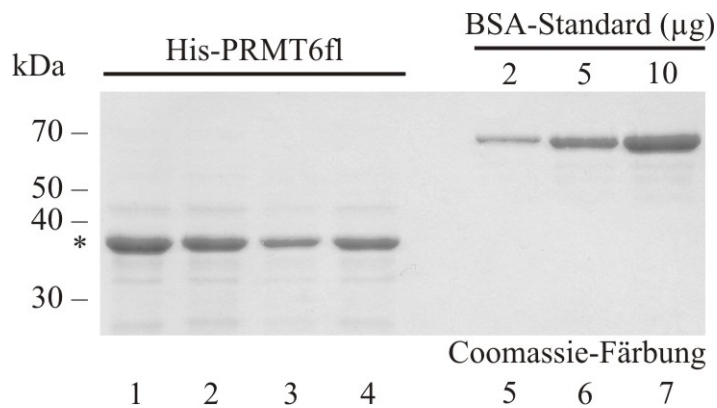


Abbildung 4.31: His-PRMT6fl Präparationen zur Generierung des PRMT6fl Antikörpers

Coomassie-Färbung. Das His-PRMT6fl Protein (Spur 1-4) wurde nach 3.3.14 aufgereinigt. Von den einzelnen Präparationen wurden je 10 µl auf das Gel aufgetragen. Vom BSA-Standard (Spur 5-7) wurden 2, 5 und 10 µg BSA aufgetragen.

Das His-PRMT6fl (*) ist bei ca. 38 kDa zu sehen. Die Verunreinigung mit anderen Proteinen war gering. Die Konzentration des Proteins in den hochkonzentrierten Präparationen (Spur 1 und 2) wurde durch Vergleich mit dem BSA-Standard (Spur 5-7) auf 0,5 µg/µl geschätzt. Für die Immunisierung eines Kaninchens wurden nach dem zugrundeliegenden Protokoll pro Injektion 100 µg des Antigens benötigt. Dies entsprach für das His-PRMT6fl Protein 200 µl der Präparationen.

Vor der Immunisierung wurde den Kaninchen Präimmunserum abgenommen, um die Anreicherung des Antikörpers nach Immunisierung beurteilen zu können. Für die Erstimmunisierung wurden 100 µg des His-PRMT6fl Proteins (200 µl) in 400 µl komplettem Freund's Adjuvants emulsiert und den Kaninchen injiziert. Im Abstand von ca. 3 Wochen wurde dann die Immunantwort durch „Boosts“ verstärkt. Dazu wurden erneut 100 µg des His-PRMT6fl diesmal mit 400 µl inkomplettem Freund's Adjuvants verabreicht.

Um die Generierung des Antikörpers zu überwachen, wurde nach dem 2. und dem 4. Boost Serum abgenommen und dieses auf seine Erkennung von verschiedenen PRMT6 Proteinen in der Immundetektion untersucht. Dazu wurden verschiedene Mengen einer GST-PRMT6- bzw. GST-Präparation (s. 3.3.12) sowie TAP-PRMT6 Überexpressions-extrakt (s. 3.3.15) aus MCF-7 Zellen einer Gelelektrophorese unterzogen und auf PVDF-Membran transferiert. Mit diesen Membranen wurden die Seren in der Immundetektion (s. 3.3.10) auf die Erkennung der PRMT6 Proteine getestet. Dazu wurden die einzelnen Seren 1:5000 in Blockmilch verdünnt und mit diesen Lösungen

Ergebnisse

die Membranen gefärbt. Die Färbungen dieser Western-Blots sind in **Abbildung 4.32** dargestellt.

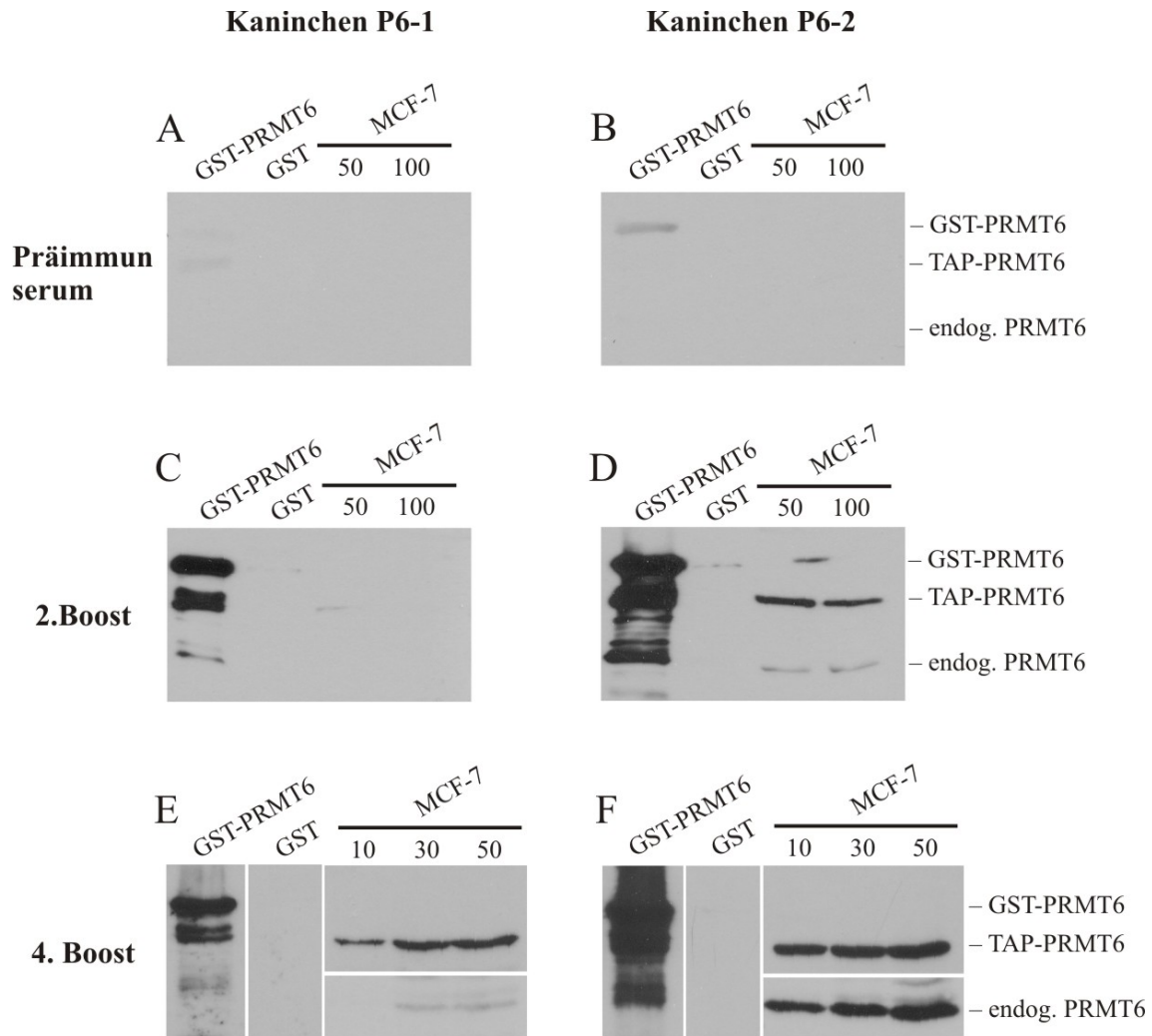


Abbildung 4.32: Überprüfung der anti-PRMT6f Antikörperseren in der Immundetektion

Immundetektion der PRMT6 Proteine mit den Kaninchenseren. Verschiedene Extrakte wurden einer 10%igen Gelelektrophorese unterzogen, auf PVDF-Membran transferiert und diese mit den jeweiligen Antikörperseren in der Immundetektion gefärbt. Die Mengen an aufgetragenen Extrakten sind: GST-PRMT6 bzw. GST 5µl in A-D und 2µl in E-F; MCF-7 TAP-PRMT6f Extrakt 50 bzw. 100µg in A-D und 10/30/50µg in E-F. Die Seren wurden 1:5000 in Blockmilch (s. 3.3.10) angesetzt.

In **Abbildung 4.32 A** und **B** wurden die Präimmunseren der beiden Kaninchen überprüft. Diese zeigten keine Detektion der PRMT6 Proteine. Lediglich das Präimmunserum des P6-2 Kaninchen erkannte sehr schwach das GST-PRMT6 (s. **Abbildung 4.32 B**). **Abbildung 4.32 C** und **D** zeigen die Färbungen mit den Seren nach dem 2.Boost. Die GST-PRMT6 Proteine wurden von beiden Seren gut erkannt. Zur

Kontrolle wurde nur der GST-Tag aufgetragen. Dieses konnte von den Antikörpern nicht detektiert werden. Die PRMT6-Proteine der MCF-7 Extrakte werden von Serum P6-2 (s. **Abbildung 4.32 D**) erkannt. Das überexprimierte TAP-PRMT6 erzeugte ein stärkeres Signal als das endogene PRMT6. Das Serum P6-1 (**C**) dagegen zeigte bei den MCF-7 Extrakten weder bei endogenem noch bei exogenem PRMT6 eine Reaktion. Nach dem 4. Boost wurden die Seren der Kaninchen ein weiteres Mal getestet (s. **Abbildung 4.32 E und F**). Das Serum aus Kaninchen P6-2 erkannte sämtliche PRMT6 Proteine: GST-PRMT6, exogenes TAP-PRMT6 und endogenes PRMT6. Das P6-1 Serum konnte ebenfalls alle PRMT6 detektieren, das endogene PRMT6 allerdings nur schwach. Die Qualität des P6-2 Antikörpers wurde nach dem 4. Boost für gut befunden und das gesamte Serum des Kaninchens gewonnen. Das P6-1 Kaninchen wurde noch zwei weitere Male immunisiert und dann ebenfalls dessen Serum komplett entnommen. Die so erhaltenen Antikörper Rohseren P6-1 und P6-2 sollten auf ihre Immunpräzipitationseigenschaften untersucht werden. Dazu wurde ein HA-PRMT6 Konstrukt in HEK293 Zellen transfiziert und aus diesen Gesamtzellextrakt hergestellt. Von diesem Extrakt wurden 200 µg für IP-Experimente eingesetzt. Für die Präzipitation setzte man 1, 5, 10 und 50 µl des jeweiligen Antikörperserums ein, sowie 5 und 10 µl des entsprechenden Präimmunserums. Die Immunpräzipitation wurde nach 3.3.19 durchgeführt, die Proteine auf PVDF-Membran transferiert und das immunpräzipitierte HA-PRMT6 mit einem HA-Antikörper (s. 2.5) nachgewiesen. Das Ergebnis dieser IP ist in **Abbildung 4.33** veranschaulicht.

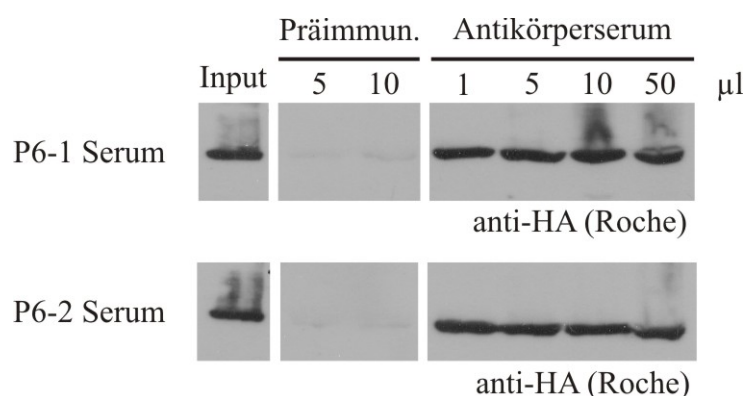


Abbildung 4.33: Immunpräzipitationstest der Antikörperseren

Immundetektion der immunpräzipitierten HA-PRMT6. 200 µg HA-PRMT6 Überexpressionsextrakt aus HEK293 Zellen wurde mit den angegebenen Mengen an Präimmun- bzw. Antikörperserum einer IP unterzogen. Das jeweilige Präimmunserum diente als Kontrollantikörper. Das immunpräzipitierte HA-PRMT6 wurde durch Immundetektion mit einem HA-Antikörper (Roche) sichtbar gemacht. Vom Input wurden 10% aufgetragen.

Sowohl das Rohserum aus Kaninchen P6-1 wie auch aus P6-2 waren in der Lage überexprimiertes HA-PRMT6 zu immunpräzipitieren. Dazu waren schon geringe Mengen des Serums von 1µl auf 200µg Zellextrakt ausreichend. Unspezifische PRMT6 Präzipitationen durch andere Kaninchenantikörper, die sich im Serum befinden, traten hierbei nicht auf.

4.4.1.1 Affinitätsaufreinigung des PRMT6fl Antikörpers über Membranen

In einem nächsten Schritt, sollte die spezifischen PRMT6 Antikörper aus dem Rohserum isoliert und angereichert werden. Dies geschah zunächst durch die Affinitätsaufreinigung über PVDF-Membran (s. 3.4.2). Dabei wurde GST-PRMT6 mittels Western-Blot auf PVDF-Membran transferiert. Das Rohserum wurde mit dieser Membran inkubiert, um den PRMT6fl Antikörper an die GST-PRMT6 zu binden. Nach Waschen der Membran eluierte man den gebunden PRMT6 Antikörper durch Einsatz eines Puffers mit niedrigen pH. Die so erhaltenen Affinitätsantikörper PRMT6-1 und PRMT6-2 wurden anschließend in der Immundetektion und Präzipitation getestet (s. **Abbildung 4.34**).

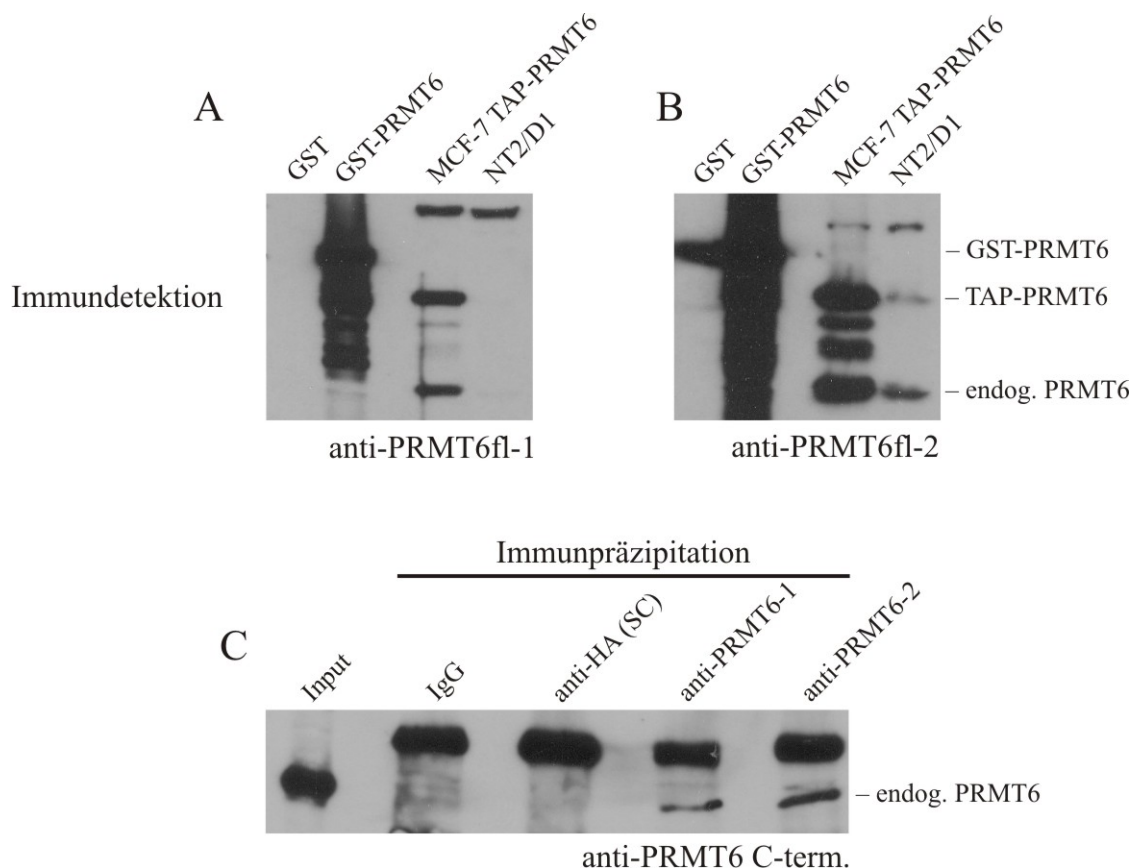


Abbildung 4.34: Test der PRMT6fl Affinitätsantikörper in der Immundetektion (A und B) bzw. Immunpräzipitation (C)

Immundetektion. (A,B) 2 µl einer GST bzw. GST-PRMT6-Präparation sowie 40 µg MCF-7 TAP-PRMT6 und NT2/D1 Gesamtzellextrakt wurden mit einer 10%igen Gelelektrophorese und anschließend dem Western-Blot auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Proteine wurden mit den jeweiligen Affinitätsantikörpern anti-PRMT6fl-1 bzw. PRMT6fl-2 in der Immundetektion erkannt. (Verdünnung: 1:200 in Blockmilch). (C) Endogenes PRMT6 aus 500 µg MCF-7 Gesamtzellextrakt wurde mit 1 µg Kaninchen IgG, 1 µg anti-HA (SC) und je 10 µl (ca. 1 µg) des anti-PRMT6fl Antikörpers immunpräzipitiert. Die präzipitierten Proteine transferierte man auf PVDF-Membran und detektierte diese mit dem C-terminalen anti-PRMT6 Affinitätsantikörper (1:200). Im Input sind 10% des eingesetzten MCF-7 Zellextrakts aufgetragen.

In **Abbildung 4.34 A** bzw. **B** sind die Immundetektionen der beiden Affinitätsantikörper zu sehen. Bei beiden waren die Spuren mit dem GST-PRMT6 komplett gefärbt und die GST-PRMT6 Bande kaum auszumachen. Die Menge an aufgetragenem GST-PRMT6 war hierbei zu hoch. Rechts daneben sind die exogene TAP-PRMT6 und das endogene PRMT6 aus MCF-7 Zellen zu erkennen. Sowohl der P6-1 wie auch der P6-2 Antikörper erkannten beide Proteine, wobei die stärkere Färbung beim P6-2 Antikörper auf eine bessere Erkennung hinweist. Dieser Unterschied wurde bei dem endogenen PRMT6 aus NT2/D1 Zellextrakten noch deutlicher. Während der anti-PRMT6fl-2 Antikörper hier eine Bande zeigte, war diese

im Fall des PRMT6fl-1 Antikörpers nicht zu sehen. Beim Vergleich der Immundetektion von PRMT6 durch diesen aufgereinigten Antikörper (s. **Abbildung 4.34**) mit der Detektion durch das Rohserum (s. **Abbildung 4.32**) ist kein deutlicher Qualitätszuwachs zu erkennen. Die Membran-Aufreinigung des P6-2 Antikörpers führte sogar zum Auftreten von Hintergrundsbanden (**B**).

In der Immunpräzipitation (**Abbildung 4.34 C**) war zwischen den Affinitätsantikörpern kein wirklicher Unterschied zu sehen. Beide immunpräzipitierten das endogene PRMT6 aus MCF-7 Wildtypextrakten ähnlich effizient. Die Antikörperkontrollen (IgG und anti-HA (SC)) waren hierbei leer.

4.4.1.2 Affinitätsaufreinigung des PRMT6fl Antikörpers durch Antigen-gekoppelte Säulen

Die Methode der Affinitätsaufreinigung von Antikörpern mittels PVDF-Membranen lieferte zwar Antikörper von guter Qualität, aber in zu geringen Mengen bei hohem Zeitaufwand. Daher wurde die Affinitätsaufreinigung über eine Antigen-gekoppelte Säule etabliert (s. 3.4.4). Das Prinzip ist dasselbe wie zuvor, nur dass das Antigen (GST-PRMT6), über das der Antikörper isoliert werden sollte in diesem Fall kovalent an eine GST-Säule gebunden wurde (s. 3.4.3). Dies geschah durch kreuzvernetzen der GST-Gruppe des Antigens mit dem Glutathion des Säulenmaterials. Dabei wurde ein Reagenz verwendet (BS³ (bis[sulfosuccinimidyl]-suberate)), das primäre Aminogruppen kovalent miteinander verbindet. Die Antikörperrohseren wurden anschließend über diese Säule gepumpt, diese von unspezifisch gebundenen Proteinen gewaschen und der spezifisch an das GST-PRMT6 gebundenen Antikörper mittels eines Puffers mit niedrigem pH (2,5) eluiert.

Die Elution für den PRMT6fl-2 Antikörper ist exemplarisch dafür in **Abbildung 4.35** aufgeführt. Dabei wurde das eingesetzte Rohserum (500µl) insgesamt zweimal über diese Säule aufgereinigt und so zweimal von Antikörper depletiert. Die Elution wurde in 200µl Fraktionen gesammelt und sofort mit 13µl 1M Tris pH 9,5 neutralisiert. Von diesen Fraktionen trug man je 1µl auf ein 10%iges Polyacrylamidgel auf, und detektierte die schwere Kette des aufgereinigten Immunglobulin G mit einem anti-Kaninchen IgG Antikörper. In **Abbildung 4.35 A** ist die Elution nach der ersten Depletion dargestellt, in **Abbildung 4.35 B** die nach der zweiten Depletion. Die Abnahme der Antikörpermengen von der ersten zur zweiten Depletion war zu sehen. Es

war außerdem ein Elutionsmaximum des Antikörpers zwischen Fraktion 12 und 16 zu erkennen. Die links und rechts davon gezeigten Fraktionen enthielten in beiden Depletionen weniger Antikörper. Die Depletion und Elution des PRMT6fl-1 Serums lieferte ähnliche Ergebnisse.

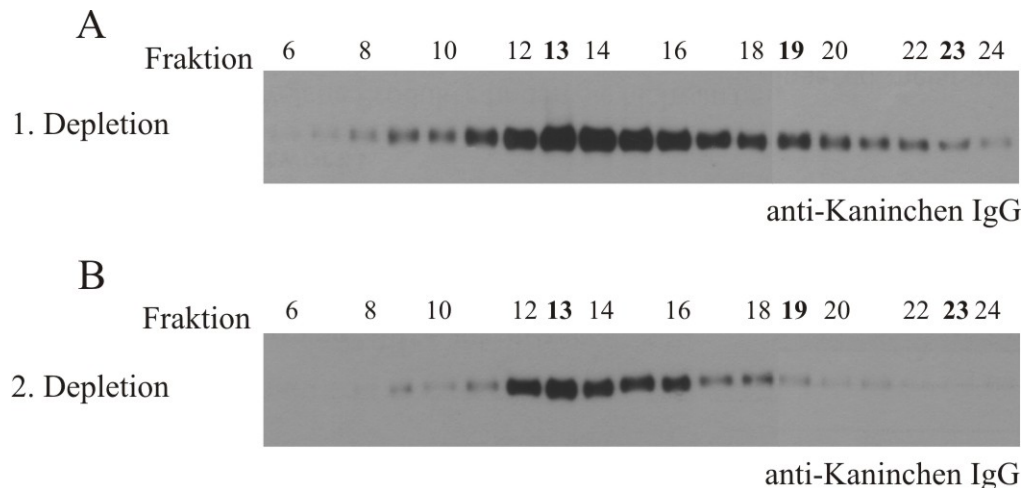


Abbildung 4.35: Elution des PRMT6fl-2 Antikörpers von der GST-PRMT6 Säule.

Immundetektion der schweren IgG-Kette des PRMT6fl-2 Antikörpers. Die Aufreinigung des Antikörpers geschah nach 3.4.4. 500 µl des anti-PRMT6fl-2 Rohserums wurden zweimal über die GST-PRMT6 gekoppelte Säule (s. 3.4.3) depletiert. Nach Bindung des Antikörpers an die Säule wurde diese ausgiebig gewaschen und mit 50 mM Glycin pH 2,5 eluiert. Die aufgefangenen 200 µl Fraktionen neutralisierte man sofort mit 13 µl 1M Tris pH 9,5. Je 1 µl dieser Fraktionen wurden durch 10%ige Gelelektrophorese aufgetrennt, auf PVDF-Membran transferiert und mit einem anti-Kaninchen IgG Antikörper (s. 2.5) in der Immundetektion sichtbar gemacht.

Um die Eigenschaften dieser Antikörperfraktionen in der Immundetektion bzw. Immunpräzipitation zu untersuchen, nahm man die Fraktionen 13, 19 und 23 zu Testzwecken. Diese wurden zum einen in der Immundetektion getestet. Dazu wurden MCF-7 TAP-PRMT6fl Zellextrakte im Western Blot (s. 3.3.10) mit den ausgewählten Fraktionen (13, 19 und 23) in einer 1:500 Verdünnung auf PRMT6 Anwesenheit untersucht. Zu Vergleichszwecken verwendete man einen PRMT6-2 Affinitätsantikörper, der über PVDF-Membran aufgereinigt wurde (Kontrolle).

Zur Überprüfung der Immunpräzipitationseffizienz der Fraktionen verwendete man ebenfalls den MCF-7 TAP-PRMT6fl Zellextrakt, um aus ihm das exo-/endogene PRMT6 zu präzipitieren. Von den Antikörperfraktionen (13, 19 und 23) setzte man 20 µl für die IP ein. Auch hier wurde ein Membran-Affinitätsantikörper als Vergleich verwendet (Kontrolle). Die präzipitierten PRMT6 Proteine wurde über Gelelektrophorese und Western Blot auf PVDF-Membran transferiert und mit dem anti-

PRMT6 C-term. Antikörper sichtbar gemacht. Die Ergebnisse der Western-Blot bzw. IP-Tests für den PRMT6fl-2 Antikörper findet sich in **Abbildung 4.36**.

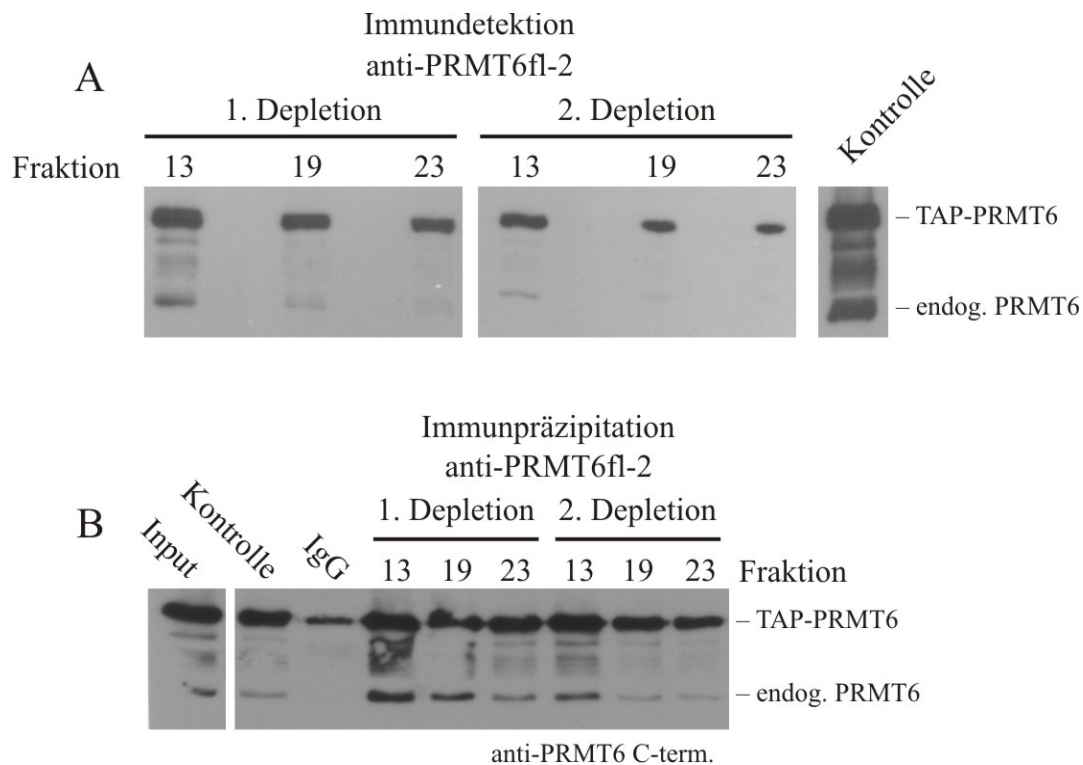


Abbildung 4.36: Test der Antikörperfraktionen in der Immundetektion (A) und der Immunpräzipitation (B)

Immundetektion. (A) 15µg MCF-7 TAP-PRMT6fl Gesamtzellextrakt wurden mit 10%iger Gelelektrophorese und Western-Blot auf PVDF-Membran transferiert. Zur Immundetektion der Proteine wurden die angegebenen Antikörperfraktionen in einer 1:500 Verdünnung in Blockmilch verwendet. Kontrolle: Ein Membran-Affinitätsantikörper PRMT6fl-2 wurde zu Vergleichszwecken eingesetzt. (B) 300 µg MCF-7 TAP-PRMT6fl Gesamtzellextrakt wurde einer IP mit 20 µl der angegebenen Antikörperfraktionen unterzogen. 20 µl eines Membran-Affinitätsantikörper PRMT6fl-2 (Kontrolle) sowie 1µg Kaninchen IgG setzte man zu Vergleich ein. Die Detektion der Proteine erfolgte mit dem C-terminalen PRMT6 Antikörper.

Abbildung 4.36 A zeigt den Test der Immundetektion. Darin erkannten die Fraktionen 13 beider Depletionen die PRMT6-Proteine am besten. Fraktion 19 und 23 detektierten das PRMT6 nicht mehr so gut. Es konnte auch ein Unterschied zwischen den beiden Depletionen ausgemacht werden. Die erste Depletion war in ihrer Detektionsqualität um ca. Faktor 2 besser als die 2. Depletion. Die Qualität der Säulen-aufgereinigten PRMT6fl Antikörper war hierbei von ihrer Detektionseffizienz schlechter, als die des Membran-aufgereinigten Antikörpers.

Der Test der Immunpräzipitation ist in **Abbildung 4.36 B** dargestellt. Fraktion 13 immunpräzipitierte sowohl exo- wie auch endogenes PRMT6 am besten. Auch hier war

der Abfall der Präzipitationseffizienz von der ersten zur zweiten Depletion zu beobachten. In der IP waren die Säulen-aufgereinigten Antikörper besser als ein Membran-aufgereinigter PRMT6fl Antikörper.

5 Diskussion

5.1 PRMT6 ist eine neue Histon-Methyltransferase

Von den 11 Mitgliedern der Protein Arginin Methyltransferasen (s. **Abbildung 1.2**) wurden bisher nur sechs PRMTs als Histon-Methyltransferasen identifiziert. Von diesen wurden für PRMT1 (Wang et al. 2001), PRMT4/CARM1 (Chen et al. 1999), PRMT5 (Pal et al. 2004) sowie PRMT7 (Jelinic et al. 2006) die Methylierungsstellen in den jeweiligen Histonen gefunden und ihre Funktion untersucht. Für PRMT8 (Lee et al. 2005a) und PRMT9 (Cook et al. 2006) ist lediglich bekannt, welche Histone methyliert werden. **Tabelle 5.1** gibt einen Überblick über diese PRMTs.

Enzym	Substrat
PRMT1	Histon H4 R3 asymm.
PRMT4	Histon H3 R2, 17, 26, 128, 129, 131, 134 asymm.
PRMT5	Histon H3 R8, Histon H4 R3 symm.
PRMT7	Histon H2A, Histon H4 R3 asymm.
PRMT8	Histon H4 asymm.
PRMT9	Histon H2A, H4 symm.

Tabelle 5.1: Protein Arginin Methyltransferasen mit bekannter *in vitro* Aktivität auf Histone
nach (Pal and Sif 2007)

Für die Arginin Methyltransferase PRMT6 wurde bislang noch keine Aktivität auf Histonen nachgewiesen. Zwar wurde gezeigt, dass PRMT6 im Zellkern lokalisiert ist (Frankel et al. 2002), doch wurde eine Histonmethylierungsaktivität von PRMT6 dabei nicht untersucht. Allerdings existierten Argumente dafür zu überprüfen ob PRMT6 in der Lage ist Histone zu methylieren. Zum einem die strukturelle Ähnlichkeit von PRMT6 mit den anderen Histon-methylierenden PRMTs (s. 1.1.2) sowie die gemeinsame Substratspezifität gegenüber Glycin-Arginin-reichen (GAR) Sequenzen, welche zum Teil auch in den Histonsequenzen von H4 oder H2A auftritt. Zuerst sollte daher untersucht werden, ob Histone als Substrate für den von PRMT6 katalysierten Methylgruppentransfer fungieren.

5.1.1 PRMT6 methyliert Histone

Die Untersuchung der *in vitro* Aktivität verschiedener PRMTs hat gezeigt, dass PRMT1 und PRMT4 wie erwartet Histon H4 bzw. H3 methylieren. Aber auch für PRMT6 wurde neben der schon bekannten Aktivität auf die GAR-Sequenz eine Methyltransferaseaktivität auf Histonen gefunden.

Bei der Methylierung einzelner Histone ergab sich, dass PRMT6 *in vitro* hauptsächlich die Histone H3, H4 und H2A methyliert. Histon H2B zeigte zwar ebenfalls ein Methylierungssignal. Dieses war aber viel geringer als die der anderen Histone. Zusätzlich zu den Kernhistonen aus Kalbsthymus wurden auch die rekombinanten Histone H3 und H4 getestet, um näher zu untersuchen ob posttranslationale Modifikationen die Aktivität der PRMT6 beeinflussen. Histone aus Kalbsthymus sind natürlicherweise posttranslational modifiziert, während rekombinante Histone aus Bakterien dies nicht sind. Die Signale der rekombinanten Histone zeigten keine maßgebliche Veränderung der PRMT6-Aktivität verglichen mit den Kalbsthymushistonen. Bereits vorliegende Modifikationen an Histonen sind also keine zwingende Voraussetzung für die PRMT6-Aktivität. Mit den Histonen H3, H4 und H2A methyliert PRMT6 daher *in vitro* drei der vier Kernhistone.

Es stellte sich an diesem Punkt die Frage, ob PRMT6 auch in der Lage ist Histone in Nukleosomen zu methylieren. Dazu wurden rekombinante Drosophila Histone als Histonoktamer in Nukleosomen assembliert (Magdalena Murawska, AG Prof. Brehm, (Brehm et al. 2000)) und in der Methyltransferasereaktion getestet. Es wurde gefunden, dass die für die Nukleosomenassemblierung verwendeten isolierten Histone von PRMT6 methyliert werden konnten. Die Nukleosomen aber stellten kein *in vitro* Substrat für PRMT6 dar. Die Methylierung der Histonoktamere zeigte, dass in diesem Experiment Histon H4 und schwächer Histon H3 methyliert werden. Die fehlende Methylierung der Nukleosomen weist darauf hin, dass falls PRMT6 *in vivo* Histone in Nukleosomen methyliert, möglicherweise weitere Proteine/Interaktionspartner für diesen Methyltransfer benötigt werden. Dies wurde bereits für PRMT4 gezeigt. Diese Methyltransferase ist nur in der Lage Nukleosomen zu methylieren, falls sie als Bestandteil des *nucleosomal methylation activator complex* (NUMAC), einem ATP-Nukleosomen Remodelling Komplex, vorliegt (Xu et al. 2004). Ähnliches wurde für PRMT5 im Zusammenhang mit den Chromatin Remodellern BRG und BRM gezeigt, wo die Histonmethylierungsaktivität von PRMT5 zunimmt, sobald dieses mit BRG und BRM interagiert (Pal et al. 2004). Die Vermutung besteht also, dass auch PRMT6

Interaktionspartner benötigt, um seine Histonsubstrate, in Nukleosomen assembliert, zu methylieren. Dieser Frage wurde in der vorliegenden Arbeit allerdings nicht weiter nachgegangen.

5.1.2 PRMT6 methyliert *in vitro* Arginin 2 in Histon H3 und Arginin 3 in Histon H4 und H2A

PRMTs methylieren Histone überwiegend in deren N-Termini. Es bestand aber die Möglichkeit dass PRMT6 Histone auch im globulären Teil methyliert, wie das für PRMT4 beispielsweise bekannt ist (s. **Tabelle 5.1**). Deshalb wurden Deletionsmutanten der Histone H3 und H4, denen der N-Terminus fehlte auf ihre Methylierung durch PRMT6 getestet. Dabei konnten für die N-terminal trunkierten Histone keine Methylierungssignale beobachtet werden. Dies deutete darauf hin, dass die Methylierungsstellen von PRMT6 in den N-Termini der Histone liegen.

Um diese Stellen zu identifizieren, wurden die *in vitro* methylierten Histone H3, H4 und H2A einer Edman-Sequenzierung unterzogen (s. 3.3.28) und die Methylierungsstellen mittels Szintillationsmessung lokalisiert. Die chromatographische Identifikation der einzelnen Aminosäuren zeigte einen sauberen Abbau der Histonenenden (nicht gezeigte Daten). Die Vermessung der Aminosäurefraktionen im Szintillationszähler ergab die folgenden Methylierungsstellen: R2 in Histon H3 sowie R3 in Histon H4 und H2A. Die gefundenen Methylierungssignale waren im Vergleich zu den Signalen anderer Arginine bzw. weiterer Hintergrundsignale sehr stark. Daher konnte bei den identifizierten Stellen davon ausgegangen werden, dass diese die spezifisch methylierten Arginine von PRMT6 in Histonen sind.

Da die ersten fünf Aminosäuren der Histone H4 und H2A identisch sind, war es nicht überraschend, dass das R3 in beiden Histonen von PRMT6 methyliert wird. Das R3 in Histon H4 scheint dabei eine bevorzugte Methylierungsstelle von PRMTs zu sein, da dieses neben PRMT1, PRMT5 und PRMT7 zumindest *in vitro* auch von PRMT6 methyliert wird.

Im Vergleich dazu war über die Methylierung des R2 in Histon H3 weniger bekannt. Diese konnte zwar mittels spezifischen Antikörpern identifiziert werden, allerdings wurde die dafür verantwortliche PRMT nicht eindeutig ermittelt. Für PRMT4 wurde zwar beobachtet (Schurter et al. 2001), dass diese neben R17 und R26 in Histon H3 auch R2 *in vitro* methyliert. Aber schon in dieser Studie (Schurter et al. 2001), wie auch in

der von (Bauer et al. 2002) wurde berichtet, dass lediglich R17 und R26 die dominierenden *in vitro* Methylierungsstellen von PRMT4 in Histon H3 sind. Außerdem wurde durch Claudia Stein in unserer AG durch Immundetektion von *in vitro* methyliertem Histon H3 gezeigt, dass PRMT4 das R2 nicht methyliert (Hyllus et al. 2007). Dies spricht dafür, dass PRMT6 die dominante *in vitro* H3R2 Methyltransferase ist.

Zusammenfassend demonstrieren diese Daten, dass PRMT6 ein neues Mitglied der Histon Arginin Methyltransferasen ist. Mit R2 in Histon H3 und R3 in Histon H4 und H2A wurden zusätzlich die *in vitro* Methylierungsstellen von PRMT6 in Histonen identifiziert.

5.1.3 Die *in vivo* Methylierung von Arginin 2 in Histon H3 durch PRMT6

Als nächstes ergab sich nun die Frage nach den *in vivo* Methylierungen der PRMT6, welche von Claudia Stein in unserer Arbeitsgruppe beantwortet wurde (Hyllus et al. 2007). Dabei wurden MCF-7 Zellklone verwendet, die entweder ein PRMT6 Konstrukt oder als Kontrolle den Leervektor stabil überexprimierten. In den PRMT6 überexprimierenden Zellen wurden durch Western Blot und Immunfluoreszenz global erhöhte Mengen an dimethyliertem R2 an Histon H3 gefunden, verglichen mit den Kontrollzellen. Entsprechend konnte Claudia Stein nach RNAi-Depletion von PRMT6 in HEK293 Zellen eine verringerte R2 Dimethylierung an Histon H3 beobachten. Studien in Mausembryonen zeigten, dass auch PRMT4 insofern eine Rolle bei der *in vivo* Methylierung des R2 in Histon H3 spielt, als dass die Mengen an H3R2Me₂ in PRMT4-null Fibroblasten sanken (Torres-Padilla et al. 2007). Demnach ist noch unklar ob, je nach Zelltyp und eventueller Assoziation mit anderen Cofaktoren, auch PRMT4 für die *in vivo* Methylierung des R2 verantwortlich ist. Desweiteren wäre auch ein Effekt von PRMT4 auf die PRMT6 Expression und damit eine Beeinflussung der H3R2Me₂ Mengen denkbar. Diesem Aspekt wurde in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht weiter nachgegangen.

Neben der R2 Methylierung wurden noch die *in vivo* Dimethylierung von R3 in Histon H4 nach PRMT6 Überexpression in MCF-7 Zellen untersucht, da diese sowohl von PRMT6 wie auch von anderen PRMTs *in vitro* katalysiert wird. Dabei konnte allerdings keine Veränderung der R3 Methylierung durch die PRMT6 Überexpression beobachtet

werden (Hyllus et al. 2007). Demnach methyliert PRMT6 Histone *in vivo* ausschließlich an R2 in Histon H3.

Zusammen mit den *in vivo* Daten von Claudia Stein konnte damit in der vorliegenden Arbeit, die für die R2 Dimethylierung hauptsächlich verantwortliche *in vivo* Methyltransferase als PRMT6 identifiziert werden.

5.1.4 PRMT6 katalysiert präferentiell die Dimethylierung von Arginin 2

Der Mechanismus der Methylierung von Argininseitenketten besteht aus zwei Schritten, der Monomethylierung und anschließend der asymmetrischen oder symmetrischen Dimethylierung des Stickstoffatoms (s. 1.1.3). PRMT6 gehört zur Gruppe der Typ I Methyltransferasen und katalysiert somit die asymmetrische Dimethylierung von Argininen (Frankel et al. 2002). Die enzymatischen Eigenschaften der PRMT6 sollten hier unter dem mechanistischen Gesichtspunkt untersucht werden, ob PRMT6 *in vitro* beide Methylierungsschritte gleichermaßen katalysiert oder einen der beiden bevorzugt. Dazu wurden Histon H3/H4-Peptide als Substrate eingesetzt, welche am jeweiligen Arginin unmodifiziert waren oder bereits mono- bzw. dimethyliert vorlagen. Die Messung der PRMT6-Aktivität gegenüber diesen Peptidsubstraten gab Auskunft über eine mögliche Präferenz bei der Methylierung. Dabei zeigte PRMT6 sowohl für das H3- wie auch für das H4-Peptid die höchste Aktivität, wenn das zu methylierende Arginin in monomethylierter Form vorlag. Die unmodifizierten Peptide wurden zwar ebenfalls methyliert, dort war die beobachtete Aktivität aber teilweise um 50-30% gegenüber den monomethylierten Peptiden reduziert. Wenn PRMT6 monomethylierte Arginine als Substrate bevorzugt, lässt dies darauf schließen, dass PRMT6 überwiegend die Dimethylierung von Argininen katalysiert.

Um diese Hypothese zu untermauern, wurden die von PRMT6 methylierten Peptide einer massenspektroskopischen Untersuchung unterzogen (s. 3.3.29), um die Mengen an gebildetem Produkt zu quantifizieren. Auch hierbei fand man für die Methylierung des monomethyl-Peptids die größte Menge an gebildetem Produkt. Wurde der PRMT6 das unmodifizierte Peptid als Substrat angeboten, ergab die Reaktion wenig monomethyliertes Produkt und keine nachweisbare Dimethylierung. Dies spricht dafür, dass PRMT6 ausgehend vom monomethylierten Arginin die Dimethylierung katalysiert.

Während der Anfertigung dieser Arbeit wurde eine enzymatische Studie über PRMT6 veröffentlicht, welche ebenfalls eine Präferenz des PRMT6 für monomethylierte Arginine beobachtet. Dies äußerte sich in einer nahezu zweifach erhöhten Reaktionsgeschwindigkeit sowie einer um ein Drittel reduzierten Michaelis-Menton-Konstante für das monomethylierte H3-Peptid verglichen mit dem unmethylierten Peptid. Außerdem wurde in der erwähnten Studie ein distributiver anstatt eines prozessiven Mechanismus für PRMT6 gefunden. Ein distributiver bzw. dissoziativer Mechanismus beschreibt die Eigenschaft des Enzyms PRMT6 das gebildete Produkt schneller aus der Bindung zu entlassen, als den nächsten Reaktionsschritt zu katalysieren (Lakowski and Frankel 2008).

Überraschend ist, dass wenn monomethyliertes Substrat bevorzugt wird, warum bei unmethyliert vorliegendem Eduktpeptid kein dimethyliertes Produkt in der massenspektrometrischen Analyse gefunden wurde. Die wenigen Mengen an gebildetem monomethyliertem Produkt sollten dann aber doch ein hervorragendes Substrat für PRMT6 darstellen. Eine mögliche Erklärung liefert der distributive Mechanismus des PRMT6, welcher besagt, dass das gebildete Produkt, in diesem Fall das monomethylierte Peptid, den Enzym-Substrat-Komplex nach der Reaktion schneller verlässt, als es dimethyliert werden kann. Die von PRMT6 monomethylierten Peptide sind im Gegensatz zu Histonen beweglicher und können nach erfolgter Monomethylierung vom Enzym schnell wegdiffundieren. Da außerdem die unmethylierten Peptide im Überschuss vorliegen, kommt es zu einer bevorzugten Methylierung dieses Substrats. Zusammen resultiert dies in ausschließlich monomethylierten Peptiden.

Falls PRMT6 tatsächlich hauptsächlich für die Dimethylierung seiner Substrate verantwortlich ist, sollte sich dies auch *in vivo* anhand der R2 Methylierung zeigen lassen. Dazu untersuchte Claudia Stein die Mengen an monomethyliertem R2 mittels Immundetektion in PRMT6-überexprimierenden MCF-7 Zellklonen. Dabei konnte keine Veränderung der Mengen an monomethyliertem R2 durch die PRMT6 Überexpression beobachtet werden.

Dies bestätigte die Vermutung, dass PRMT6 eine Arginin Dimethyltransferase ist. Bisher wurde für den Großteil der aktiven PRMTs gezeigt, dass diese sowohl die Mono- wie auch die Dimethylierung katalysieren können (Bedford and Richard 2005). PRMT6 mit seiner Eigenschaft lediglich die Dimethylierung zu katalysieren, unterscheidet sich dadurch von anderen Arginin Methyltransferasen. Desweiteren stellt sich die Frage nach

der Dynamik der Argininmethylierung. Falls PRMT6 Arginine nur dimethyliert, existiert dann möglicherweise eine PRMT, die diese Arginine in einer nötigen „Vorreaktion“ zuerst monomethyliert, so dass PRMT6 diese dann dimethylieren kann. Für PRMT7 wurde beispielsweise beobachtet, dass diese synthetische Glycin-Argininreiche Peptide *in vitro* lediglich monomethyliert (Miranda et al. 2004).

5.2 Die Rolle von PRMT6 im Histoncode

Da von der Arginin Methyltransferase PRMT6 nun bekannt war, dass diese Histone methyliert und insbesondere für die *in vivo* Dimethylierung des R2 in Histon H3 zuständig ist, ergab sich als nächster Schritt die Untersuchung der R2 Methylierung und ihre potentielle Rolle im Histoncode.

Wie in Abschnitt 1.2.2 beschrieben können Histonmodifikationen die Genexpression in positiver oder negativer Weise beeinflussen, also aktive oder repressive Markierungen darstellen. Von nahezu allen bekannten PRMTs mit Histonmethylierungsaktivität sind die von ihnen katalysierten Modifikationen und deren Auswirkungen auf den Histoncode teils sehr intensiv dokumentiert worden. So wurde für die PRMT1-vermittelte Histon H4 R3 Methylierung eine aktivierende Rolle nachgewiesen, welche sie bei der durch nukleäre Rezeptoren regulierten Genexpression besitzt (Strahl et al. 2001; Wang et al. 2001). Die Methylierung von R17 in Histon H3, die durch PRMT4 katalysiert wird, hat in diesem Zusammenhang ebenfalls eine aktivierende Funktion bei der Genregulation (Bauer et al. 2002; Daujat et al. 2002). PRMT5 dagegen und seine Histonmarkierung an H4R3 führen zu einer Repression von Genen, durch Rekrutierung des MBD2/NuRD-Komplexes an diese Promotoren (Le Guezennec et al. 2006).

Für die R2 Dimethylierung in Histon H3 wurde soweit keine eindeutige Funktion gefunden. ChIP-on-Chip Studien an c-Myc Zielgenpromotoren haben aber demonstriert, dass H3R2Me₂ in Chromatinbereichen auftritt, welche auch von einer Gruppe repressiver Histonmodifikationen wie H3K27Me₃ oder H4R3Me₂asym. besiedelt sind. Im Gegensatz dazu war die Dimethylierung an R2 nicht in transkriptionell aktiven Regionen mit euchromatischen Markierungen wie H3K4Me₃, H3R26Me₂ oder Lysinacetylierung (an K9, K14, K18 und K27 in Histon H3) zu finden. Außerdem trat die R2 Methylierung nicht zusammen mit einer anderen Gruppe repressiver Markierungen auf, die häufig am Heterochromatin gefunden werden, wie zum Beispiel die H3K9 oder die H4K20 Methylierung (Guccione et al. 2006). Das gepaarte Auftreten

von R2Me₂ mit bestimmten repressiven Modifikationen, sowie der Ausschluss der R2 Dimethylierung von Bereichen mit aktiven Markierungen ließ eine repressive Funktion für H3R2Me₂ vermuten.

Eine repressive Rolle der PRMT6-vermittelten R2 Methylierung bei der Genregulation konnte Claudia Stein, durch Experimente mit PRMT6-überexprimierenden MCF-7 Zellen, bestätigen. Sie beobachtete eine verminderte Genexpression bestimmter Hox- und c-Myc-Zielgenen in den PRMT6 Überexpressionszellen. So wurde beispielsweise für die Gene HoxA2 und HoxA10 eine Repression beobachtet, während HoxA5 und HoxA6 unbeeinflusst blieben (Hyllus et al. 2007).

5.2.1 Suche nach Interaktionspartnern der Arginin 2 Dimethylierung

Um die Funktion der R2 Methylierung in einem ersten Schritt zu untersuchen wurde nach spezifischen Interaktionspartnern für diese Modifikation gesucht. Posttranslationale Modifikationen in Histon N-Termini können dazu führen, dass bestimmte Effektor-Proteine durch sie an die Histonenden binden (s. 1.2.3), wie beispielsweise das HP1 Protein an die Methylierung am K9 in Histon H3 (Fischle et al. 2003). Umgekehrt können Modifikationen die Affinität der Effektor-Proteine aber auch verringern, wie es im Falle des HP1 und der Phosphorylierung an S10 zu beobachten ist (Hirota et al. 2005).

Um nach Effektor-Proteinen für die R2 Methylierung zu suchen, wurden Peptid-Pulldowns verwendet. Dabei wurden synthetisch vormodifizierte Histon H3-Peptide an Sulfolink-Gel gekoppelt um gebundene Proteine später präzipitieren zu können. Diese Peptide wurden mit unterschiedlichen Zellextrakten inkubiert und eventuell gebundene Proteine durch Immundetektion oder Silber- bzw. Coomassiefärbung mit anschließender massenspektrometrischen Analyse identifiziert. Die H3-Peptide beinhalteten dabei die ersten 30 Aminosäuren des N-Terminus und waren entweder unmodifiziert oder am R2 mono- bzw. asymmetrisch dimethyliert. Außerdem wurde auch die Trimethylierung an K27 mit untersucht, da aufgrund des gepaarten Auftretens beider Modifikationen in bestimmten Chromatinbereichen ein Zusammenhang zwischen R2 und K27 vermutet wurde (Guccione et al. 2006).

Die massenspektroskopische Identifizierung der differentiellen Banden in den Silberfärbungen ergab die Proteine SET/TAF I und Nucleophosmin, deren Bindungsmuster auf eine verstärkte Affinität zu R2Me₂ und zu K27Me₃ hindeutete. Für

eine weitere Bande, die eine scheinbar verminderte Bindung an R2Me₂ aufwies, lieferte die MS-Analyse kein eindeutiges Ergebnis. Bei jedem der drei Peptide wurde ein anderes Protein mit höchstem Score gefunden. Jedoch fand man für das MBD3 Protein, dass dessen Anzahl an identifizierten Peptiden in den jeweiligen Banden mit der Stärke dieser Banden übereinstimmte. In den starken Banden am unmodifizierten bzw. K27 trimethylierten H3-Peptid wurde MBD3 mit hohem Score und vielen Peptiden gefunden, während es am R2 dimethyliertem H3-Peptid lediglich am Ende der Liste identifizierter Proteine mit gerade einmal 2 Peptiden zu finden war. Da dies nur für dieses Protein zutraf wurde für diese Bande MBD3 als zutreffendes Protein angenommen.

Die Histonbindung des SET/TAF I Proteins war schon Gegenstand einer anderen Arbeit in unserer Gruppe (Wagner et al. 2006) und wurde daher in der vorliegenden Arbeit nicht näher untersucht. Die Überprüfung des Bindungsverhaltens der Proteine Nucleophosmin und MBD3 durch Immundetektion zeigte allerdings ein zu den Silberfärbungen unterschiedliches Bindungsmuster. So wurde im Falle des MBD3 nicht der vermutete negative Einfluss einer R2 Dimethylierung auf dessen Bindung beobachtet, sondern eher eine stärkere Affinität zum R2Me₂ und zum K27Me₃ im Vergleich zum unmodifizierten H3-Peptid. Bei der Immundetektion des Nucleophosmin ergab sich keine eindeutiges Ergebnis. Auch dort wurde eine erhöhte Bindung am methylierten R2 bzw. R27 gefunden, wie es auch in den Silberfärbungen zuvor beobachtet wurde. Allerdings wurden bei einem Großteil der Immundetektionen auch andere uneinheitliche Bindungsmuster gefunden, so dass die für Nucleophosmin vermutete Bindung an das methylierte R2 bzw. K27 nicht reproduzierbar war.

Ein generelles Problem dieser Pulldown-Methode mit anschließender Silberfärbung war die hohe Anzahl bindender Proteine am unmodifizierten H3-Peptid. Diese Banden konnten auch an den modifizierten Peptiden ausgemacht werden und erschwerten die Suche nach differentiell interagierenden Proteinen. Banden mit unterschiedlicher Bindung an die einzelnen Peptide wurden dagegen nur wenig beobachtet. Vermutlich weil diese meist zu schwach waren um in der Silberfärbung erkannt zu werden und außerdem, da sie von den unspezifisch bindenden Proteinen überlagert wurden. Hinzukommt, dass das Auftreten differentieller Banden, durch eine unterschiedliche Silberfärbungseffizienz bei verschiedenen Proteinen einer Bande, vorgetäuscht werden kann. Diese Probleme bei der Silberfärbung der Pulldowns sowie die mittels Immundetektion nicht reproduzierbaren Bindungsmuster der gefundenen Proteine

MBD3 und Nucliosmin ließen zu dem Schluss kommen, dass diese Methode zur Identifikation von spezifischen Interaktionspartnern der R2 Methylierung nicht verwendet werden konnte.

Um in Zukunft neue Proteine zu finden, die im Rahmen des Histoncodes posttranslationale Modifikationen erkennen können, wurden in den letzten Jahren spezifischere Methoden etabliert. Die SILAC-Technik (Stable Isotope Labeling with Amino acids in Cell culture) ist dabei eine vielversprechende Vorgehensweise (Ong et al. 2003). Dabei werden durch den Einsatz von Wachstumsmedien mit verschiedenen Argininisotopen Proteine mit verschiedenen Molekulargewichten hergestellt. Nach erfolgtem Peptid-Pulldown können unterschiedliche Bindungsmuster von Proteinen dann in einer massenspektrometrischen Analyse aufgrund der unterschiedlichen Massen direkt quantifiziert werden. Die Bindung des TFIID Komplex an trimethyliertes Lysin4 in Histon H3 beispielsweise wurde auf diese Weise entdeckt (Vermeulen et al. 2007).

5.2.2 Untersuchung des potentiellen Zusammenhangs zwischen Arginin 2 und Lysin 27 Methylierung an Histon H3

Als weitere Eigenschaft der R2 Dimethylierung in Histon H3 sollte der mögliche Zusammenhang mit der Trimethylierung von K27 untersucht werden. Aufgrund des gemeinsamen Auftretens dieser Modifikationen kam die Vermutung auf, ob die beiden dafür verantwortlichen Enzyme EZH2 und PRMT6 an die jeweils andere Modifikation binden können und sich dadurch die R2 und die K27 Methylierung bedingen.

Dies sollte wiederum mittels Peptid-Pulldowns mit den jeweiligen Enzymen herausgefunden werden. Dazu wurde die Bindung der einzelnen Proteine an die Histon H3-Peptide (unmodifiziert, R2Me₂, K27Me₃) direkt durch Immundetektion ermittelt. Für die Komponenten des PRC2-Komplexes, der die Trimethylierung des K27 katalysiert, wurde keine Bindung an das dimethylierte R2 Histon H3-Peptid gefunden. Umgekehrt konnte für endogenes, wie auch für überexprimiertes PRMT6 ebenfalls keine Histonbindung an trimethyliertes K27 beobachtet werden.

Falls ein gegenseitiger positiver Einfluss zwischen R2 und K27 Methylierung existiert, wird dieser scheinbar nicht durch eine unmittelbare Bindung der Enzyme an die jeweils andere Modifikation hervorgerufen. Zumindest konnten mit der Methode der *in vitro* Peptid-Pulldowns keine Hinweise dafür gefunden werden.

Das PRMT6 allein zeigte kaum Bindungsaffinität zu Histon N-Termini. Die Rekrutierung dieses Enzym an das Chromatin wird daher vermutlich durch andere Proteine bewerkstelligt die mit PRMT6 assoziiert sind. Für PRMT6 konnten bisher keine im Chromatinkontext auftretenden Interaktionspartner gefunden werden, welche diese Funktion aufweisen.

5.2.3 Die Aktivität von PRMT6 wird von anderen Histonmodifikationen beeinflusst

Ein Merkmal des Histoncodes ist die gegenseitige Beeinflussung von Histonmodifikationen. Während die Anwesenheit einer Modifikation eine andere begünstigt, kann sie aber das Vorhandensein einer weiteren Modifikation verhindern. Dadurch ergeben sich Kombinationen von Histonmarkierungen, welche funktionell ähnliche Rollen erfüllen (Jenuwein and Allis 2001). Aktivierende bzw. repressive Modifikationen können untereinander einen positiven Einfluss haben, während sie sich gegenseitig ausschließen können (s. 1.2.2).

Diese gegenseitige Beeinflussung kann schon auf Ebene der enzymatischen Aktivität geregelt werden, wenn vorhandene Modifikationen die Katalyse einer weiteren erleichtern oder behindern. Ein Beispiel dafür ist die Phosphorylierung von S10 in Histon H3. Ist S10 phosphoryliert (aktivierende Markierung), kann SUV39H sein Substrat K9 (repressive Markierung) nicht methylieren (Rea et al. 2000). Dafür wird die Acetylierung von K14 (aktivierende Markierung) durch Gcn5 bei phosphoryliertem S10 erleichtert (Lo et al. 2000).

Für PRMT6 sollte daher ermittelt werden, ob deren Aktivität auf R2 durch bereits vorhandene andere Histonmodifikationen verändert wird. Dass rekombinante, unmodifizierte Histone von PRMT6 sehr gut methyliert werden können, weist darauf hin, dass das generelle Vorhandensein von unterschiedlichen Modifikationen keinen messbaren Einfluss auf die Aktivität besitzt. Um einen spezifischen Effekt einzelner Modifikationen zu untersuchen, wurden *in vitro* Methyltransferasereaktionen mit synthetisch vormodifizierten H3-Peptiden durchgeführt. Dabei wurde die Methylierungsaktivität des PRMT6 durch eine Di-/Trimethylierung am K4 oder am K9 stark vermindert. Eine Di-/Trimethylierung des K27 dagegen hatte einen schwachen positiven Effekt auf die PRMT6 Aktivität.

Dies weist auf einen negativen Einfluss der K4- bzw. der K9 Methylierung auf die PRMT6-Aktivität hin. Dies entspricht den *in vivo* Daten von (Guccione et al. 2006), die zeigen konnten, dass sich die R2 Methylierung und die Methylierung von K4 an bestimmten Genpromotoren ausschließen. Die R2 und die K9 Methylierung hingegen treten laut diesen Daten ebenfalls nicht zusammen auf. Da in dieser Arbeit eine repressive Funktion der R2 Methylierung vermutet wird, wäre das nicht gemeinsame Auftreten mit der K9 Methylierung ein Hinweis auf repressive Funktionen dieser beiden Histonmarkierungen in getrennten Chromatinbereichen.

Der positive Effekt der K27 Methylierung auf die PRMT6-Aktivität weist auf eine Kooperation dieser beiden Histonmarkierungen hin. Das gemeinsame Auftreten in Chromatinregionen wurde in Genom-weiten Untersuchungen zuvor beobachtet (Guccione et al. 2006). Allerdings konnte der hier beobachtete begünstigende Einfluss von K27Me₃ auf die PRMT6-Methyltransferaseaktivität beim Einsatz exogener PRMT6-Enzymquellen nicht bestätigt werden (nicht gezeigte Daten). Der Einfluss der R2 Methylierung auf die Aktivität von EZH2 wurde zwar untersucht, war aber nicht auswertbar, so dass hierzu keine Aussage gemacht werden kann.

Ein ähnlicher, positiver Effekt konnte für die PRMT4-vermittelte R17 Methylierung in Histon H3 durch eine bereits vorliegende Acetylierung an K23 und vor allem an K18 beobachtet werden (Daujat et al. 2002). Eine Studie der Substraterkennung von PRMT1 untersuchte benachbarte Aminosäuren des Arginins, dabei aber nur die direkten Nachbarn und auch nur im Kontext eines RXG- bzw. RGX-Motivs (Wooderchak et al. 2008). Wie die Beeinflussung der PRMT6-Aktivität durch die hier gefundenen Modifikationen auf Ebene der Proteinstruktur zustande kommt wurde bisher nicht untersucht. Denkbar ist aber eine Verringerung bzw. Verstärkung der Affinität der Bindungsregion der PRMT zum Histonpeptid durch die jeweilige Modifikation. In den Kristallstrukturen der PRMTs wurden bisher lediglich die Bindung des Arginins und nicht die benachbarter Aminosäuren untersucht (s. 1.1.2).

5.2.4 Regulation der Lysin 4 Trimethylierung durch die PRMT6-vermittelte Arginin 2 Dimethylierung

Während für die K27 Methylierung eine positive Beziehung zur R2 Methylierung vermutet wurde, lieferten die *in vitro* Studien der PRMT6-Aktivität in dieser Arbeit sowie die ChIP-on-Chip Daten von (Guccione et al. 2006) Hinweise auf eine negative Beeinflussung zwischen der R2 Methylierung und der K4 Trimethylierung in Histon H3. Das Ziel war daher diese negative Beziehung zwischen den Histonmarkierungen H3R2Me₂ und H3K4Me₃ zu bestätigen und in Bezug auf die Genregulation funktionell zu charakterisieren.

5.2.4.1 Einfluss von PRMT6 auf die c-Myc Genexpression

Der vermutete negative Effekt von H3R2Me₂ auf H3K4Me₃ kann, aufgrund des aktivierenden Einflusses der K4 Trimethylierung auf die Transkription, anhand einer veränderten Genexpression detektiert werden. Dies konnte Claudia Stein in unserer Arbeitsgruppe bereits an Hox bzw. c-Myc-Zielgenen demonstrieren (Hyllus et al. 2007). Ziel der vorliegenden Arbeit war die Genexpressionskontrolle durch PRMT6 in einem natürlichen Regulationsmechanismus zu untersuchen.

Es wurde daher nach einem Gen gesucht, dessen Expression durch die K4 Trimethylierung reguliert wird und durch einen Stimulus induzierbar ist. Diese Bedingungen treffen für das c-Myc Gen im Wnt-Signalweg zu, wobei im Falle der Aktivierung der Cofaktor β -Catenin in den Zellkern wandert, dort an den Transkriptionsfaktor LEF-1/TCF bindet, wodurch die entsprechenden Zielgene wie c-Myc exprimiert werden (Gregorieff and Clevers 2005). Dabei interagiert die C-terminale Domäne des β -Catenin mit dem MLL1/2 Komplex, welcher die Trimethylierung des K4 katalysiert. Durch diese Interaktion steigen die Mengen an trimethyliertem K4 im Falle der Wnt-Aktivierung an und die Genexpression von c-Myc wird vorangetrieben (Sierra et al. 2006).

Das Abschalten der Genexpression bei fehlendem Wnt-Stimulus geschieht über Phosphorylierung des β -Catenins durch Glycogen Synthase Kinase-3 β (GSK-3 β) und anschließendem Abbau durch einen Degradationskomplex welcher aus den Proteinen Axin, Protein Phosphatase 2A und *adenomatous polyposis coli* (APC) besteht (Xing et al. 2003). Dieser bindet das β -Catenin und entfernt es aus der Interaktion mit dem

Transkriptionsfaktor LEF-1/TCF. Anschließend wird β -Catenin dem proteolytischen Abbaumechanismus zugeführt. Dieses Abschalten des Wnt-Signalwegs kann durch eine induzierbare Überexpression des APC-Proteins in HT-29 Kolonkarzinomzellen stimuliert werden. Diese besitzen lediglich C-terminal trunkiertes, nicht funktionelles APC, weshalb der Wnt-Signalweg dort kontinuierlich aktiviert vorliegt. Erst die Induktion der APC-Expression führt zu der Inaktivierung dieses Mechanismus. Um das APC induzierbar zu exprimieren wurden spezielle HT-29 Klone verwendet, welche eine APC-Überexpressionskonstrukt stabil integriert haben, das durch Zink induziert wird (He et al. 1998).

Diese Zellen wurden verwendet um die c-Myc-Genexpression induzierbar zu reprimieren. Dabei zeigte sich, dass die Induktion mit Zinkchlorid zu einer Expression des APC und damit zu der gewünschten Repression des c-Myc führte. Allerdings war auch in den Kontrollzellen eine Verringerung der c-Myc Genexpression zu beobachten. Um eine Funktion der PRMT6-vermittelten R2 Dimethylierung bei der Repression durch den Wnt-Signalweg nachzuweisen, wurden die HT29 Zellen mittels siRNA von PRMT6 depletiert und die c-Myc Genexpression nach Zinkchlorid Induktion beobachtet. Obwohl die Depletion der PRMT6 Proteinmenge sehr deutlich war, konnte bei der Repression der c-Myc Genexpression kein Unterschied zwischen PRMT6-depletierten und unbehandelten HT-29 APC Zellen ausgemacht werden. In beiden Fällen sank die Menge an c-Myc Transkript gleichmäßig durch die APC-Induktion. Hätte die durch PRMT6 vermittelte Methylierung des R2 bei diesem Prozess einen negativen Einfluss auf die K4 Trimethylierung und somit auf die Genexpression, würde man im Falle der PRMT6-depletierten Zellen höhere c-Myc Transkriptmengen erwarten. Da dies nicht der Fall war, muss davon ausgegangen werden, dass der vermutete Effekt von PRMT6 auf die K4 Methylierung in diesem Signalweg keine Rolle spielt.

Es ist zu beachten, dass die Behandlung der Zellen mit Zinkchlorid an sich einen repressiven Effekt auf die Genexpression zur Folge hat. Sowohl die c-Myc mRNA-Mengen in den HT-29 β -Gal Kontrollzellen, wie auch die PRMT6 mRNA-Mengen in den siRNA unbehandelten HT-29 Zellen, nahmen durch die Zinkchlorid-Induktion ab. Dies lässt auf einen unerwünschten Einfluss des Zinkchlorids unabhängig von der APC-Induktion schließen. Daher wurde das HT-29 Modellsystem als unzureichend für die weitere Untersuchung des Einflusses der R2 Methylierung auf die Genexpression angesehen.

5.2.4.2 Die Aktivität bzw. Bindung des MLL-Komplexes wird durch die Arginin 2 Methylierung verringert

Als nächstes sollte die negative Beziehung zwischen R2Me₂ und K4Me₃ auf molekularer Ebene aufgeklärt werden. Und zwar unter dem Gesichtspunkt, ob die Methylierung des R2 in Histon H3 die Methylierung des K4 auf enzymatischer Ebene negativ beeinflussen kann. Dies könnte zu einem durch Inhibition der K4-Methylierungsaktivität eintreten, oder durch Behinderung der Bindung des K4 Methyltransferasekomplexes an den Histon H3 N-Terminus.

Für H3K4Me₃ wurde ein inhibitorischer Effekt auf die *in vitro* PRMT6-Aktivität gefunden. Ob dies auch umgekehrt der Fall ist, sollte anhand der K4 Methyltransferasen Set7/9 und MLL1 untersucht werden. Die *in vitro* Methyltransferaseaktivität von Set7/9 wurde durch eine Methylierung des R2 in Histone H3 nicht verändert. Die *in vitro* Aktivität der MLL1-Methyltransferase dagegen wurde durch die R2 Monomethylierung erheblich beeinträchtigt und durch die Dimethylierung sogar komplett inhibiert. Set7/9 katalysiert die Monomethylierung des K4 (Xiao et al. 2003), während MLL1 für sämtliche Methylierungsstufen des K4, aber hauptsächlich für die Trimethylierung zuständig ist (Dou et al. 2005). Somit konnte ein direkter Effekt der R2 Methylierung auf die enzymatische Aktivität der K4 Methyltransferase MLL1 bestätigt werden, was vermuten lässt, dass spezifisch die MLL-vermittelte Trimethylierung des K4 durch PRMT6 beeinflusst wird.

Die K4 Trimethylierung wird durch den MLL-Komplex katalysiert (s. 1.2.4) dessen Komponente WDR5 die Aufgabe hat den Histon H3 N-Terminus zu binden. Zunächst wurde vermutet, dass diese Komponente spezifisch das dimethylierte K4 in H3 erkennt und somit den MLL-Komplex an den N-Terminus rekrutiert, sodass die Trimethylierung vollzogen werden kann (Dou et al. 2005; Wysocka et al. 2005). Allerdings wurden im Jahr 2006 parallel drei Studien veröffentlicht, welche die Kristallstruktur des WDR5 zusammen mit dem am K4 dimethyliertem H3 Histonende auflösen (Couture et al. 2006; Han et al. 2006; Ruthenburg et al. 2006). Dort konnte gezeigt werden, dass nicht primär das K4 von der Bindungstasche des WDR5 gebunden wird. Messungen der Bindungsaffinität von H3 Peptiden mit unterschiedlich methyliertem K4 mittels Oberflächenplasmonenresonanz ergaben eine schwache Präferenz für das dimethylierte K4, allerdings war der Unterschied zu den anderen Methylierungsstufen nicht so deutlich, als dass WDR5 in der Lage wäre diese Stufen effektiv unterscheiden zu können (Ruthenburg et al. 2006). Vielmehr wird nun

angenommen, dass die Funktion des WDR5 darin besteht, den H3 N-Terminus zu binden und das zu methylierende K4 frei zugänglich für die enzymatische Komponente MLL zu machen. Außerdem wurde beobachtet, dass für die Interaktion mit WDR5 sind die ersten drei Aminosäuren A1, R2 und T3 des Histon H3 essentiell sind. Weiterhin interessant an diesen Untersuchungen ist die Tatsache, dass bei der Bindung des WDR5 an den H3 N-Terminus vor allem das Arginin in Erscheinung tritt (s. **Abbildung 5.1**).

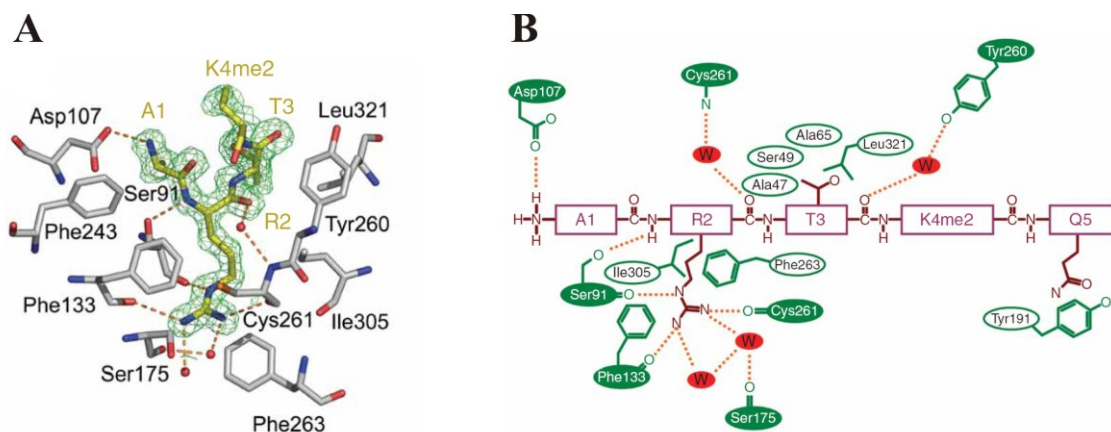


Abbildung 5.1: Arginin 2 in Histon H3 wird von WDR5 gebunden

(A): Röntgenkristallstruktur der Bindungstasche von WDR5 mit gebundenem H3K4Me₂ Peptide (aa1-4)
 (B): Darstellung der Interaktionen zwischen WDR5 und dem Histon H3 Peptid
 (Couture et al. 2006)

Die Seitenkette des R2 ragt in die Bindungstasche des WDR5 hinein, welche aus sieben WD40-Domänen gebildet wird und geht dadurch unterschiedliche Interaktionen mit dieser ein: van-der-Waals Bindung mit I305, H-Brücken mit den Carboxylgruppen von S91, F133, S175, C261 sowie die Kation- π Wechselwirkung der Guanidinogruppe des R2 mit den aromatischen F133 und F263 (Couture et al. 2006). Diese Vielzahl an Interaktionen mit der Guanidinogruppe des Arginin ließ vermuten, dass der Methylierungsstatus des R2 die Stärke dieser Bindung beeinflussen könnte. Die kalorimetrische Untersuchung der Bindungsaffinität von mono- und dimethyliertem R2 ergab, dass WDR5 das Histon H3 Peptid nicht mehr binden kann, sobald das Arginin methyliert vorliegt (Couture et al. 2006). Dies führte zu dem Schluss, dass der Methylierungszustand des R2 in Histon H3 für die Bindung des WDR5 ausschlaggebend ist.

Somit ergab sich eine mögliche Regulation der Bindung von WDR5 an das Histon H3 durch die Methylierung des R2. Die Dimethylierung des R2 könnte die Bindung des WDR5 verhindern. Dies sollte in dieser Arbeit mittels eines Peptid-Pulldowns mit vormodifizierten H3-Peptide und einem überexprimierten Flag-WDR5 Konstrukt bzw. endogenem WDR5 bestätigt werden. Wie sich zeigte, verlor das WDR5 seine Bindungsfähigkeit zum Histon H3 Peptid im Falle einer Dimethylierung des R2. Somit könnte das WDR5 den H3-Terminus nicht mehr binden und das Substrat K4 dem MLL-Komplex nicht mehr zugänglich machen, wodurch eine Methylierung des K4 erschwert werden würde. Möglicherweise wird durch das Ausbleiben einer Bindung von WDR5 auch die Rekrutierung des gesamten MLL-Komplex an das Histon H3 unterbunden. Allerdings widersprachen Peptid-Pulldowns mit endogenem MLL dieser Vermutung, da dort eine von R2 unabhängige Bindung des MLL an das H3-Peptid beobachtet wurde. Diese Experimente identifizieren WDR5 als ein erstes Effektor-Protein, welches die R2 Dimethylierung in Zusammenhang mit dem Histoncode auslesen kann. WDR5 kann nur binden, wenn R2 unmethyliert vorliegt.

Es ist etwas überraschend, dass dieses Protein bei der Suche nach H3R2Me₂-Interaktionspartnern mittels Peptid-Pulldowns nicht gefunden wurde (s. 4.2.1). Es ist anzunehmen, dass die Bindung des WDR5 an das Histonpeptid im Vergleich zu den anderen dort gefundenen Proteinbanden sehr schwach ist und deshalb nicht detektiert werden konnte. Dies spricht wiederum dafür, dass Peptid-Pulldowns mit anschließender Silberfärbung kein verlässliches Mittel sind, um neue Effektor-Proteine des Histoncodes zu identifizieren.

Letztlich lieferten diese Experimente zwei Indizien dafür, dass eine Methylierung des R2 in Histon H3 die Methylierung des K4 erschweren oder verhindern könnte. Zum einen die Inhibition der *in vitro* Aktivität der Lysinmethyltransferase MLL und zum zweiten die Unterbindung einer Interaktion der MLL-Komplexkomponente WDR5 mit dem Histon H3 N-Terminus durch eine Dimethylierung des R2.

Die negative Regulation der H3K4Me₃ durch die H3R2Me₂ konnte *in vivo* durch die Arbeiten von Claudia Stein bestätigt werden (Hyllus et al. 2007). Hierzu wurden die RNAi-Depletion von PRMT6 in HEK293 Zellen verwendet, welche zu einer globalen Reduktion der Dimethylierung des R2 führte. Durch Immundetektion der Trimethylierung des K4 in Histon H3 konnte gezeigt werden, dass diese bei verminderter R2 Dimethylierung anstieg. Dieser Effekt wurde auch im umgekehrten Fall für die Überexpression von PRMT6 und somit erhöhter R2 Dimethylierung in

MCF-7 Zellen beobachtet. Dort wurde mittels Western Blot und Immunfluoreszenz eine Reduktion der K4 Trimethylierung beobachtet, was ebenfalls den negativen Einfluss der R2Me₂ bestätigte.

5.2.4.3 Die Funktion der Arginin 2 Methylierung bei Chromatinprozessen

Claudia Stein hat in ihren Arbeiten gezeigt, dass die Überexpression von PRMT6 in MCF-7 Zellen zu einer spezifischen Repression des HoxA2 Gens führte, während die Expression von HoxA5 unbeeinflusst blieb (Hyllus et al. 2007). Es sollte daher überprüft werden ob der Mechanismus dieser spezifischen Repression der HoxA Genexpression auf die Regulation der K4 Trimethylierung zurückzuführen ist.

Dazu wurden zuerst die Rekrutierung der PRMT6 sowie das Auftreten der H3R2Me₂ bzw. H3K4Me₃ am HoxA2 Promotor durch ChIP Experimente untersucht. Nach PRMT6-Überexpression wurden dort eine erhöhte Assoziation der PRMT6 mit dem Chromatin und dementsprechend auch eine verstärkte R2 Dimethylierung beobachtet. In Übereinstimmung mit der Vermutung wurde eine reduzierte Trimethylierung des K4 an diesem Promotor vorgefunden. Im 3'-Bereich dieses Gens konnten diese Effekte nicht beobachtet werden. Wie die K4Me₃ so ist demnach auch die R2Me₂ eine Histonmodifikation, welche ihre Regulatorfunktion im 5'-Bereich des regulierten Gens ausübt. Die Repression des HoxA2 Gens nach PRMT6-Überexpression lässt sich damit auf eine Regulation der K4 Trimethylierung durch PRMT6-vermittelte R2 Methylierung zurückführen.

Anschließend wurde die Rekrutierung der MLL-Komplexkomponenten MLL und WDR5 in diesen Regionen des HoxA2 Gens untersucht. Wie durch die Ergebnisse der Peptid-Pulldowns nahegelegt (s. 4.3.2.2), führt die verstärkte R2 Methylierung im Promotorbereich zu einer abgeschwächten Rekrutierung des WDR5. Aber auch die Rekrutierung von MLL selbst wurde durch die Methylierung des R2 verringert. Dies spräche für ein Modell bei dem die R2 Methylierung die Rekrutierung des gesamten MLL-Komplexes an die entsprechenden Chromatinregionen steuert. Das momentan gängige Modell besagt, dass WDR5 zwar für die Trimethylierung des K4 essentiell ist, nicht aber für die Rekrutierung des MLL-Komplexes ans Chromatin (Wysocka et al. 2005; Dou et al. 2006). Wie die R2 Methylierung also zu einem Ablösen des MLL führt ist noch unklar. Die Peptid-Pulldowns mit MLL zeigten keinen Einfluss dieser Modifikation auf die Histonbindung des MLL.

Die HoxA5 Genexpression zeigte keinerlei Beeinflussung durch die PRMT6 Überexpression und wurde deshalb als Negativkontrolle verwendet. Die PRMT6 Überexpression führte am Promotor des HoxA5 Gens weder zu einem Anstieg der PRMT6-Rekrutierung noch zu einer vermehrten R2 Methylierung. Es konnten auch keine Effekte auf die Rekrutierung von MLL und WDR5 bzw. die Trimethylierung des K4 ausgemacht werden. Dies ist ein Beleg für die Spezifität der Genregulation durch PRMT6, welche im Promotorbereich bestimmter Gene stattfindet.

Um die Funktion für PRMT6 im Rahmen eines natürlichen Regulationsmechanismus zu bestätigen, wurde die Genexpression des HoxA Genlokus während der Differenzierung von NT2/D1 Zellen untersucht. In Verlauf dieser durch all-*trans*-Retinsäure induzierten Differenzierung wird eine Gruppe von HoxA Genen reprimiert, während andere HoxA Gene aktiviert werden (Bracken et al. 2006). HoxA2 gehört zur Gruppe der Gene, welche im undifferenzierten Zustand der NT2/D1 Zellen inaktiviert vorliegt und erst durch die Differenzierung aktiviert wird.

Um eine Regulation des HoxA2 Gens durch PRMT6 zu untersuchen, wurden ChIP Experimente am dessen Promotor während der NT2/D1 Differenzierung durchgeführt. Im undifferenzierten Zustand war PRMT6 am Promotor rekrutiert was zu einer Methylierung des R2 in Histon H3 führte. Die K4 Trimethylierung liegt nur in geringen Mengen vor. Während der Differenzierung nimmt die Rekrutierung der PRMT6 ab, womit eine Reduktion der R2 Dimethylierung einher geht. Dies wiederum führt zu einem deutlichen Anstieg der K4 Trimethylierung.

Somit konnte die repressive Funktion der durch PRMT6 vermittelten R2 Dimethylierung im Rahmen eines biologischen Regulationsmechanismus bestätigt werden. Vor der Differenzierung methyliert PRMT6 das H3R2 im HoxA2 Promotor und reprimiert diesen dadurch. Während der Differenzierung verlässt PRMT6 den Promotor, wodurch die R2 Methylierung abnimmt was zu einem Anstieg der K4 Methylierung und somit zu Genaktivierung führt.

5.2.5 Modell der Genregulation durch PRMT6

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gefunden werden, dass die von PRMT6 katalysierte Dimethylierung des R2 in Histon H3 einen negativen Einfluss auf die Trimethylierung des K4 besitzt. Zum einen reduziert diese Histonmodifikation (H3R2Me₂) die Aktivität der K4 Methyltransferase MLL, welche für die K4Me₃ verantwortlich ist. Umgekehrt

wird auch die PRMT6 Aktivität durch eine Trimethylierung des K4 am H3 N-Terminus inhibiert. Desweiteren verhindert die Dimethylierung des R2 die Bindung der WDR5-Komponente des MLL-Komplex an das Histon H3, was ebenfalls eine Voraussetzung für die Trimethylierung des K4 ist. Somit konnten die molekularen Ursachen für die negative Beeinflussung der K4Me₃ durch die R2Me₂ identifiziert werden.

Dass dieser negative Einfluss der R2Me₂ auf die Transkriptions-aktivierende Modifikation K4Me₃ zu einer reprimierten Genexpression führt, konnte anhand der HoxA Gene durch die Daten von Claudia Stein bestätigt werden. Zusammen mit den ChIP Experimenten der vorliegenden Arbeit an ausgewählten HoxA Promotoren konnte folgendes Modell für die Promotorereignisse während der Genregulation durch PRMT6 erstellt werden (s. **Abbildung 5.2**).

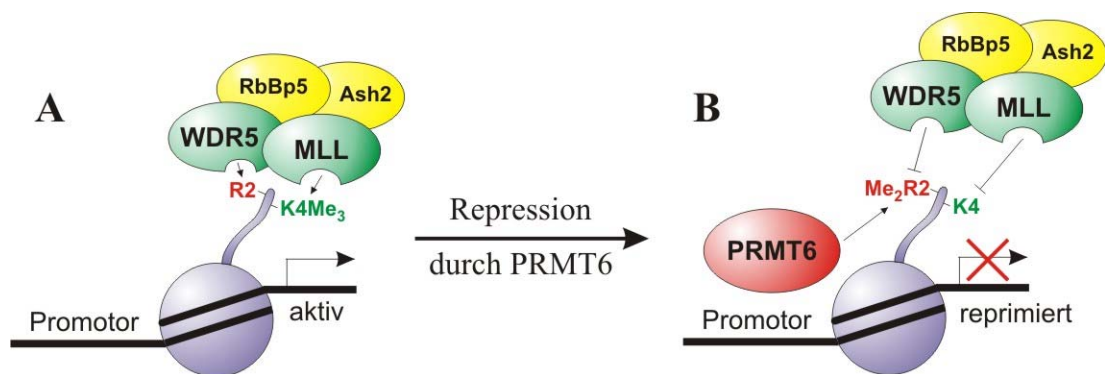


Abbildung 5.2: Modell der Genregulation durch PRMT6

(A) Im aktiven Zustand ist R2 in Histon H3 unmethyliert wodurch der MLL-Komplex das K4 trimethylieren kann, was zur Genexpression führt. (B) Im reprimierten Zustand dimethyliert PRMT6 das R2, was die Bindung von WDR5 und die Trimethylierung des K4 durch MLL verhindert.

Im aktivierten Zustand des Gens (**Abbildung 5.2 A**) ist PRMT6 nicht am Promotor rekrutiert, sodass R2 nicht dimethyliert vorliegt. Das unmethylierte R2 kann von WDR5 erkannt werden, wodurch der MLL-Komplex den H3 N-Terminus binden und das K4 trimethylieren kann. Die Trimethylierung von K4 erlaubt die Expression dieses Gens. Bei der Repression des Promotors (**Abbildung 5.2 B**) wird PRMT6 rekrutiert und dimethyliert das R2 in Histon H3. Das dimethylierte R2 verhindert nun einerseits die Bindung des WDR5 wie auch direkt die Methylierung des K4 durch MLL. Damit ist dieser Promotor am K4 nicht trimethyliert, was letztlich zur Repression des Gens führt. Dadurch ergibt sich ein Bild wie die R2 Dimethylierung in Histon H3 die Methylierung des K4 unterbinden kann und sich diese Modifikationen gegenseitig ausschließen, was schon zuvor durch Genom-weite Untersuchungen vermutet wurde (Guccione et al.

2006). Zusätzlich zu der Aufklärung dieses Mechanismus konnte PRMT6 als dafür verantwortliches Enzym identifiziert werden und muss daher als neuer Faktor bei der Entschlüsselung des Histoncodes berücksichtigt werden.

Dieser Mechanismus der PRMT6-vermittelten Genregulation wurde parallel von zwei weiteren Arbeitsgruppen aufgedeckt. Die Arbeitsgruppe die schon den gegenseitigen Ausschluss der R2 und der K4 Methylierung entdeckt hat, konnte ebenfalls PRMT6 als R2 methylierende *in vivo* Methyltransferase identifizieren. Auch der gegenseitige negative Effekt der Histonmodifikationen auf die Enzymaktivitäten von PRMT6 und des MLL-Komplexes bzw. auf die Bindung des WDR5 an den Histon H3 N-Terminus wurde beschrieben. In Genom-weiten ChIP-on-Chip Studien zeigte sich dort, dass die R2 Dimethylierung in der Mitte und am 3'-Ende von Genen vorkommt und zwar unabhängig vom transkriptionellen Zustand des Gens. Im Promotorbereich wurde die R2 Dimethylierung nur bei inaktiven Genen gefunden, die dort auch keine K4 Trimethylierung aufwiesen. Dadurch konnte der negative Regulationsmechanismus durch die R2 Methylierung bestätigt werden (Guccione et al. 2007).

Eine andere Arbeitsgruppe befasste sich mit Genom-weiten Studien in Hefezellen (*Saccharomyces cerevisiae*). Auch hier wurde die Existenz der asymmetrischen R2 Dimethylierung in Histon H3 gefunden. Diese tritt in Hefezellen in heterochromatischen und inaktiven euchromatischen Genbereichen auf, sowie im 3'-Bereich von transkriptionell gering aktivierten Genen und schließt sich mit dem Auftreten der K4 Trimethylierung aus. Die Methylierung des R2 hat auch in Hefe einen negativen Einfluss auf die Trimethylierung des K4 durch den Lysinmethyltransferasekomplex Set1. Dies geschieht durch die Inhibition der Bindung der Spp1-Unterkomponente dieses Komplexes an den H3 N-Terminus. Einzig die Argininmethyltransferase, welche das H3R2 in Hefe methyliert, konnte nicht identifiziert werden (Kirmizis et al. 2007).

5.3 Offene Fragen und Ausblick

Offen bleibt die Frage, ob die Dimethylierung des R2 lediglich die Rekrutierung des WDR5 an den Promotor oder gleich des ganzen MLL-Komplexes verhindert. Die Peptid-Pulldowns mit MLL dieser Arbeit wie auch die Daten von (Wysocka et al. 2005) sprechen dafür, dass MLL alleine durchaus noch am Chromatin sitzen kann. Da die ChIP-Experimente der vorliegenden Arbeit für MLL keine Rekrutierung im Falle der

R2 Dimethylierung zeigten, muss davon ausgegangen werden, dass diese Modifikation durch eine andere Art und Weise zu einer Dissoziation des MLL vom Chromatin führt. Desweiteren stellt sich die Frage nach der Dynamik dieser Chromatinprozesse. Da sich diese beiden Modifikationen an R2 und K4 gegenseitig ausschließen, muss es eine Möglichkeit geben diese auch wieder zu entfernen, falls der Zustand des Promotors wieder geändert werden soll, wie es bei der Differenzierung beispielweise der Fall ist. Da man bei der Methylierung von Argininen oder Lysinen lange Zeit davon ausging, dass diese Modifikationen irreversibel sind, wurde zunächst vermutet, dass das Entfernen derselben nur durch Histonaustausch erreicht werden kann. In den letzten Jahren konnten allerdings für die Lysinmethylierung zwei Gruppen von Enzymen identifiziert werden, welche fähig sind diese Markierung rückgängig zu machen. Zum einen die Demethylase LSD1 (*lysine specific demethylase 1*), die auf die Mono- und Dimethylierung des K4 wirkt (Shi et al. 2004). Zum anderen die Gruppe der JmjC (*Jumonji C*) Enzyme, bei denen im Fall der Proteins RBP2 die Fähigkeit nachgewiesen wurde sämtliche Methylierungsstufen des K4 zu entfernen (Christensen et al. 2007). Für die Arginin Demethylierung wurde mit JMJD6 (*Jumonji domain-containing 6*) erst kürzlich eine Demethylase gefunden, welche dimethyliertes R3 in Histon H4 und R2 in Histon H3 demethylieren kann (Chang et al. 2007). Die Existenz dieser Demethylasen erlaubt es den hier vorgestellten Regulationsmechanismus als dynamisch und reversibel anzusehen. Dabei ist die genaue Funktion bzw. die Interaktion dieser Demethylasen mit den hier genannten Proteinen noch nicht ausreichend untersucht worden.

In Zusammenhang mit der Dynamik der R2 Methylierung ist die Rolle der Monomethylierung des R2 noch zu berücksichtigen. Es konnte gezeigt werden, dass PRMT6 lediglich für die Dimethylierung des R2 verantwortlich ist (s. 4.1.3 und (Lakowski and Frankel 2008)). Passend hierzu wird die Histonbindung des WDR5 durch die Monomethylierung an R2 nur gering beeinträchtigt (s. 4.3.2.2). Auch die Methyltransferaseaktivität von MLL wird durch R2Me₁ nicht völlig inhibiert (s. 4.3.2.1). Dies ergibt für das Modell die Möglichkeit, dass im aktivierten Zustand des Promotors, das R2 nicht notwendigerweise unmethyliert vorliegen müsste, sondern in einem monomethylierten „Wartezustand“ wäre und erst im Falle der Repression durch PRMT6 dimethyliert wird. Dies würde eine schnellere Repression des Promotors ermöglichen.

Eine weitere Frage, welche sich bei diesem Mechanismus ergibt, ist die Rekrutierung bzw. die Regulation der PRMT6 selbst. Pulldown-Experimente konnten für PRMT6

allein keine Histonbindungsfähigkeit zeigen (s. 4.2.2.2). Daher ist anzunehmen, dass andere Chromatin-assoziierte Proteine benötigt werden, um PRMT6 an seine Zielpromotoren zu bringen. Soweit konnte für PRMT6 allerdings keine Interaktion mit regulatorischen Proteinen gefunden werden, die in den hier gezeigten Prozessen tätig sind. Auch die Untersuchungen der *in vitro* Aktivität der PRMT6 auf Nukleosomen zeigen, dass PRMT6 allein nicht in der Lage ist diese zu methylieren. Für einige PRMTs ist eine Regulation ihrer Funktion durch andere Proteine gezeigt worden. Die Aktivität der PRMT4 auf Nukleosomen wird erst durch die Kooperation mit dem NUMAC-Komplex erreicht (Xu et al. 2004) und die Methylierung von H4R3 durch PRMT1 bei der Retinsäurerezeptor-gesteuerten hämatopoetischen Differenzierung wird durch die Interaktion mit Btg-2 verstärkt (Passeri et al. 2006). Für PRMT6 ist soweit noch keine regulatorische Interaktion mit anderen Proteinen bekannt, wie dies beispielsweise in Form eines Multi-Protein-Komplexes auftreten könnte.

Die Fähigkeit der PRMT6 über die R2 Methylierung die Trimethylierung des K4 und damit die Genexpression zu steuern, charakterisiert die Arginin Methyltransferase PRMT6 als neues Mitglied der Gruppe von Proteinen, welche eine Rolle bei der Funktion des Histoncodes spielen. Neben den hier untersuchten Hoxgenen konnte der regulatorische Effekt der PRMT6 auf die Genexpression auch bei bestimmten Myc-Zielgenen ausgemacht werden (Daten von Claudia Stein, (Hyllus et al. 2007). Somit ergeben sich noch weitere Fragen nach zusätzlichen Funktionen bzw. Auswirkungen der R2 Dimethylierung auf Chromatinereignisse. Außerdem liefert der hier identifizierte Mechanismus die Möglichkeit die Regulation der Genexpression gerade im Zusammenhang der Zelldifferenzierung und Entwicklung weiter zu untersuchen.

6 Zusammenfassung

Das primäre Ziel der vorliegenden Arbeit bestand in der Untersuchung der Histonmethyltransferaseaktivität von PRMT6. Trotz der Tatsache, dass PRMT6 im Zellkern lokalisiert ist und für einige andere PRMTs Histonmethylierung gefunden wurde, blieb die Argininmethylierung in Histonen durch PRMT6 bisher unerforscht.

Es konnte hier gezeigt werden, dass PRMT6 *in vitro* die Histone H3, H2A und H4 methyliert. Während ungebundene Histonproteine Substrate von PRMT6 waren, traf dies für Histone in Nukleosomen *in vitro* nicht zu. Die Methylierungsstellen konnten in den N-Termini der Histone lokalisiert werden und als R2 in Histon H3 sowie R3 in Histon H4 und H2A identifiziert werden. Bei der Charakterisierung des Methylierungsmechanismus ergab sich eine Präferenz von PRMT6 für monomethylierte Arginine, was die PRMT6 als Methyltransferase ausweist, welche bevorzugt die Dimethylierung von Argininen katalysiert. In Bezug auf die Methylierung des R2 konnten Einflüsse benachbarter Methylierungen auf die *in vitro* PRMT6-Aktivität ausgemacht werden. So wirkten die Methylierungen an K4 und K9 inhibierend, während die Methylierung des K27 einen schwachen positiven Effekt zeigte.

Das daran anschließende Ziel bestand in der Untersuchung der Funktion der H3R2 Dimethylierung im Zusammenhang des Histoncodes. Es sollten mögliche Bindungsproteine (Effektor-Proteine) für diese Modifikation gefunden werden. Dazu wurden Peptid-Pulldowns mit synthetisch modifizierten H3-Peptiden durchgeführt und nach differentiell bindenden Proteinen gesucht. Diese Methode konnte allerdings keine spezifischen Interaktionspartner identifizieren. Auch ein vermuteter Zusammenhang zwischen der PRMT6 und dem PRC2-Komplex, sowie den entsprechenden Modifikationen an R2 und K27 konnte mittels dieser Peptid-Pulldowns nicht betätigt werden.

Frühere Studien der Lokalisation der R2 Di- bzw. der K4 Trimethylierung an bestimmten Genpromotoren sowie Untersuchungen der Genexpression von c-Myc Ziel- bzw. HoxA Genen bei PRMT6 Überexpression lieferten Hinweise auf einen repressiven Effekt der PRMT6-vermittelten R2 Dimethylierung. Zur weiteren Überprüfung dieses Mechanismus wurde zuerst die Genregulation des c-Myc Gens durch den Wnt-Signalweg untersucht. Dabei konnte durch RNAi-vermittelte Depletion kein Einfluss der PRMT6 auf die Genexpression dieses Gens gefunden werden.

Um den negativen Effekt der R2 Dimethylierung auf die Trimethylierung des K4 auf mechanistischer Ebene zu beschreiben, wurde die *in vitro* Aktivität der K4 Trimethyltransferase MLL sowie die Histon H3 Interaktion der MLL-Komplexkomponente WDR5 in Abhängigkeit von der R2 Dimethylierung untersucht. Hierbei konnte gezeigt werden, dass sowohl die Methyltransferaseaktivität von MLL wie auch die Bindung des WDR5 an den Histon H3 N-Terminus durch eine Dimethylierung des R2 verhindert wird. Der inhibitorische Effekt der R2 Methylierung auf die Methylierung des K4 konnte spezifisch durch Chromatin-IPs *in vivo* am HoxA2 Promotor nachgewiesen werden, wo eine PRMT6 Überexpression zu verstärkter PRMT6 Rekrutierung und R2 Dimethylierung führte. Diese wiederum hatte die verminderte Assoziation von MLL und WDR5 mit diesem Promotor zur Folge und somit eine Reduktion der Trimethylierung des K4. In einem Modell neuronaler Differenzierung konnten diese Ereignisse am HoxA2 Gen bestätigt werden und zusätzlich die repressive Funktion der PRMT6-vermittelten R2 Dimethylierung auf die Genexpression aufgezeigt werden.

Zusammenfassend charakterisieren die Daten dieser Arbeit PRMT6 als neue Histonmethyltransferase, die R2 in Histon H3 dimethyliert. Desweiteren wurde eine spezifische Genregulationsfunktion der PRMT6 im Zusammenhang mit dem Histon-Code identifiziert, bei welcher die H3K4Me₃-vermittelte Expression bestimmter Genpromotoren durch die H3R2Me₂ reprimiert wird.

7 Summary

The primary goal of this work was to characterise the histone methyltransferase activity of PRMT6. Despite the fact that PRMT6 was found to be mainly nuclear localised and that several PRMT members exhibit activity towards histones, the histone-methylation by PRMT6 has not been investigated so far.

In this work PRMT6 was found to methylate histones H3, H2A and H4 *in vitro*. Free histones were substrates of PRMT6, whereas nucleosomes could not be methylated by PRMT6 *in vitro*. The methylation sites were localized in the N-termini of histones and identified as R2 in histone H3 and R3 in histones H4 and H2A, respectively. The characterisation of the methylation mechanism resulted in a catalytic preference of PRMT6 for monomethylated arginines. This indicates that PRMT6 is mainly responsible for the dimethylation of arginines. Considering the methylation of R2 in histone H3 other histone modifications were found to exhibit an influence on the *in vitro* activity of PRMT6. While methylation of K4 and K9 in H3 inhibited PRMT6 activity, methylation of K27 increased PRMT6 activity.

Subsequently, the investigation of H3R2 dimethylation function in the context of the histone code was the next goal of this work. This should be achieved by identifying potential binding partners (effector proteins) for this modification. Peptide pulldowns with synthetically modified histone H3-peptides were used to search for differentially interacting proteins. This technique did not result in the identification of specific interaction partners for H3R2 dimethylation. A supposed functional relationship between PRMT6 and the PRC2-complex as well as between their corresponding modifications R2 and K27 could not be confirmed using peptide pulldowns.

Recent studies considering the genome-wide localisation of R2 di- and the K4 trimethylation suggested a negative cross-talk between these histone marks. Additionally, PRMT6 overexpression experiments demonstrated a repressive effect of PRMT6 on the expression of distinct HoxA genes and c-myc targets. The regulation of c-myc gene expression by the Wnt-pathway was used to further characterise the regulation mechanism of PRMT6. RNAi-mediated PRMT6-knockdown exhibited no effect of PRMT6 on the gene expression of c-myc in this context.

Alternatively, the negative cross-talk between R2Me₂ and K4Me₃ should be described on the mechanistic level. Therefore, the *in vitro* influence of R2 dimethylation on K4 trimethyltransferase MLL activity as well as on histone binding affinity of MLL-

Summary

complex subunit WDR5 was investigated. The R2 dimethylation exerted a strong inhibitory effect on MLL activity and on WDR5 binding to the histone H3-tail. The negative effect of R2 methylation on K4 methylation could be verified *in vivo* using chromatin immunoprecipitation on the HoxA2 promoter in PRMT6 overexpressing cells. Exogenous PRMT6 levels resulted in increased PRMT6 and R2 dimethylation levels at the promoter and decreased K4 trimethylation as well as reduced recruitment of MLL and WDR5. These promoter events were described in a model of neuronal cell differentiation, which confirmed the model for the repressive function of PRMT6-mediated R2 dimethylation in gene regulation.

Together, the data from the present work identify PRMT6 as a novel histone methyltransferase, which dimethylates R2 in histone H3. Furthermore, the specific gene regulation mechanism for PRMT6 was characterised in the context of the histone code, where H3R2Me₂ regulates H3K4Me₃-mediated expression of certain genes.

8 Abkürzungen

Englische Begriffe sind kursiv dargestellt.

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
APC	<i>Adenomatous Polyposis Coli</i>
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
Ash2	<i>absent, small, or homeotic discs 2</i>
ATP	Adenosintriphosphat
ATRA	all- <i>trans</i> -Retinsäure
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
bp	Basenpaar
BPTF	<i>Bromodomain PHD finger Transcription Factor</i>
BS ³	Bis[sulfosuccinimidyl]-suberate
BSA	Bovines Serumalbumin
Btg-2	<i>B-cell Translocation Gene 2</i>
bzw.	beziehungsweise
C	Cystein
CARM1	<i>Coactivator Associated Arginine Methyltransferase 1</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CHD1	<i>Chromo-ATPase/helicase-DNA-binding</i>
ChIP	Chromatinimmunpräzipitation
Ci	Curie
cm ²	Quadratzenimeter
cpm	<i>counts per minute</i>
C _T	<i>threshold cycle</i>
C-t.	C-terminal
dATP	Desoxyadenintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat

Abkürzungen

E	Glutaminsäure
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EED	<i>Embryonic Ectoderm Development</i>
EZH2	<i>Enhancer of Zeste 2</i>
F	Phenylalanin
fl	<i>full length</i>
G	Glycin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
GAR	Glycin-Arginin-reich
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunden
H ₂ O _{bid}	bidestilliertes Wasser
HAT	Histone Acetyltransferasen
HDAC	Histone Deacetylasen
HEK	<i>Human Embryonic Kidney</i>
HeLa	Henrietta Lacks
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
His	Histidin
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
HMGA	<i>High Mobility Group A</i>
hnRNP	Heteronukleäres Ribonukleinprotein
Hox	<i>Homeobox</i>
HP1	Heterochromatin Protein 1
HPC	<i>Human Polycomb</i>
HPH	<i>Human Polyhomeotic</i>
HRP	<i>horse radish peroxidase</i>
IgG	Immunoglobulin G
IP	Immunpräzipitation
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
JMJD6	<i>Jumonji domain-containing 6</i>
K	Lysin
kDa	Kilodalton
LB	Luria Bertoni
LEF-1/TCF	<i>Lymphoid enhancer-binding factor 1/ T cell factor</i>
LSD1	<i>lysine specific demethylase 1</i>
mA	Milliampere
MBD3	<i>Methyl-CpG-binding Domain Protein 3</i>
MBT	<i>Malignant Brain Tumor</i>
min	Minuten

ml	Milliliter
MLL	<i>Mixed Lineage Leukemia</i>
mM	Millimolar
mm	Millimeter
MRE11	<i>Meiotic Recombination 11</i>
NF-κB	<i>Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B Cells</i>
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NPM	Nucleophosmin
N-t.	N-terminal
NTA	Nitrilotriacetat
NUMAC	<i>nucleosomal methylation activator complex</i>
NuRD	<i>Nucleosome Remodeling and Deacetylase</i>
NURF	<i>Nucleosome Remodelling Factor</i>
OD	Optische Dichte bei 600 nm
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>Phosphate-buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PEI	Polyethylenimin
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PHD	<i>Plant Homeodomain</i>
PIAS	<i>Protein Inhibitors of Activated STAT</i>
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PRC	<i>Polycomb Repressive Complex</i>
PRMT	Protein Arginin Methyltransferase
PTM	Posttranslationale Modifikation
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qPCR	quantitative <i>Polymerase Chain Reaction</i>
R	Arginin
RbAp	<i>RB-associated protein</i>
RbBP	<i>RB-binding protein</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT-qPCR	reverse Transkriptase – qPCR
S	Serin
SAH	S-Adenosyl-L-homocystein
SAM	S-Adenosyl-L-methionin
SAM-pTS	S-Adenosyl-L-methionin <i>p</i> -Toluenesulfonat
SDS	Sodium Dodecylsulfat
sec	Sekunden
Set	<i>Su(var)3-9, Enhancer of Zeste, Trithorax</i>

Abkürzungen

SET Protein	<i>Patient SE Translocation Protein</i>
SH3	<i>Src-homology 3</i>
SILAC	<i>Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture</i>
siRNA	short interfering RNA
STAT	<i>Signal Transducers and Activators of Transcription</i>
Strep	Streptavidin
SUMO	<i>Small Ubiquitin-like Modifier</i>
SUZ12	<i>Suppressor of Zeste 12</i>
SWI/Snf	<i>SWItch/Sucrose NonFermentable</i>
T	Threonin
TAF I	<i>Template Activating Factor I</i>
TAF3	<i>TBP Associated Factor 3</i>
TAP	<i>Tandem Affinity Purification</i>
Tat	<i>Trans-Activator of Transcription</i>
TBS	<i>Tris-buffered Saline</i>
TE	Tris-EDTA
TEMED	Tetramethylethylendiamin
U/ μ l	Units pro μ l
U/min	Umdrehungen pro Minute
WDR5	<i>WD repeat domain 5</i>
WT	Wildtyp
YY1	Yin Yang 1
α	anti
β -Gal	β -Galactosidase
Δ	delta

9 Literaturverzeichnis

- Aagaard, L., Laible, G., Selenko, P., Schmid, M., Dorn, R., Schotta, G., Kuhfittig, S., Wolf, A., Lebersorger, A., Singh, P.B., Reuter, G., and Jenuwein, T. 1999. Functional mammalian homologues of the *Drosophila* PEV-modifier Su(var)3-9 encode centromere-associated proteins which complex with the heterochromatin component M31. *The EMBO journal* **18**(7): 1923-1938.
- Abramovich, C., Yakobson, B., Chebath, J., and Revel, M. 1997. A protein-arginine methyltransferase binds to the intracytoplasmic domain of the IFNAR1 chain in the type I interferon receptor. *The EMBO journal* **16**(2): 260-266.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D.J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic acids research* **25**(17): 3389-3402.
- An, W., Kim, J., and Roeder, R.G. 2004. Ordered cooperative functions of PRMT1, p300, and CARM1 in transcriptional activation by p53. *Cell* **117**(6): 735-748.
- Bauer, U.M., Daujat, S., Nielsen, S.J., Nightingale, K., and Kouzarides, T. 2002. Methylation at arginine 17 of histone H3 is linked to gene activation. *EMBO Rep* **3**(1): 39-44.
- Bedford, M.T. and Richard, S. 2005. Arginine methylation an emerging regulator of protein function. *Molecular cell* **18**(3): 263-272.
- Bernstein, B.E., Kamal, M., Lindblad-Toh, K., Bekiranov, S., Bailey, D.K., Huebert, D.J., McMahon, S., Karlsson, E.K., Kulbokas, E.J., 3rd, Gingeras, T.R., Schreiber, S.L., and Lander, E.S. 2005. Genomic maps and comparative analysis of histone modifications in human and mouse. *Cell* **120**(2): 169-181.
- Boisvert, F.M., Dery, U., Masson, J.Y., and Richard, S. 2005. Arginine methylation of MRE11 by PRMT1 is required for DNA damage checkpoint control. *Genes & development* **19**(6): 671-676.
- Boulanger, M.C., Liang, C., Russell, R.S., Lin, R., Bedford, M.T., Wainberg, M.A., and Richard, S. 2005. Methylation of Tat by PRMT6 regulates human immunodeficiency virus type 1 gene expression. *Journal of virology* **79**(1): 124-131.
- Boulanger, M.C., Miranda, T.B., Clarke, S., Di Fruscio, M., Suter, B., Lasko, P., and Richard, S. 2004. Characterization of the *Drosophila* protein arginine methyltransferases DART1 and DART4. *The Biochemical journal* **379**(Pt 2): 283-289.
- Bracken, A.P., Dietrich, N., Pasini, D., Hansen, K.H., and Helin, K. 2006. Genome-wide mapping of Polycomb target genes unravels their roles in cell fate transitions. *Genes & development* **20**(9): 1123-1136.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* **72**: 248-254.

- Branscombe, T.L., Frankel, A., Lee, J.H., Cook, J.R., Yang, Z., Pestka, S., and Clarke, S. 2001. PRMT5 (Janus kinase-binding protein 1) catalyzes the formation of symmetric dimethylarginine residues in proteins. *The Journal of biological chemistry* **276**(35): 32971-32976.
- Brehm, A., Langst, G., Kehle, J., Clapier, C.R., Imhof, A., Eberharder, A., Muller, J., and Becker, P.B. 2000. dMi-2 and ISWI chromatin remodelling factors have distinct nucleosome binding and mobilization properties. *The EMBO journal* **19**(16): 4332-4341.
- Buchwald, G., van der Stoop, P., Weichenrieder, O., Perrakis, A., van Lohuizen, M., and Sixma, T.K. 2006. Structure and E3-ligase activity of the Ring-Ring complex of polycomb proteins Bmi1 and Ring1b. *The EMBO journal* **25**(11): 2465-2474.
- Cardozo, T. and Pagano, M. 2004. The SCF ubiquitin ligase: insights into a molecular machine. *Nature reviews* **5**(9): 739-751.
- Chang, B., Chen, Y., Zhao, Y., and Bruick, R.K. 2007. JMJD6 is a histone arginine demethylase. *Science (New York, NY)* **318**(5849): 444-447.
- Chen, D., Ma, H., Hong, H., Koh, S.S., Huang, S.M., Schurter, B.T., Aswad, D.W., and Stallcup, M.R. 1999. Regulation of transcription by a protein methyltransferase. *Science (New York, NY)* **284**(5423): 2174-2177.
- Cheng, X. and Roberts, R.J. 2001. AdoMet-dependent methylation, DNA methyltransferases and base flipping. *Nucleic acids research* **29**(18): 3784-3795.
- Christensen, J., Agger, K., Cloos, P.A., Pasini, D., Rose, S., Sennels, L., Rappsilber, J., Hansen, K.H., Salcini, A.E., and Helin, K. 2007. RBP2 belongs to a family of demethylases, specific for tri-and dimethylated lysine 4 on histone 3. *Cell* **128**(6): 1063-1076.
- Cook, J.R., Lee, J.H., Yang, Z.H., Krause, C.D., Herth, N., Hoffmann, R., and Pestka, S. 2006. FBXO11/PRMT9, a new protein arginine methyltransferase, symmetrically dimethylates arginine residues. *Biochemical and biophysical research communications* **342**(2): 472-481.
- Couture, J.F., Collazo, E., and Trievel, R.C. 2006. Molecular recognition of histone H3 by the WD40 protein WDR5. *Nat Struct Mol Biol* **13**(8): 698-703.
- Czermin, B., Melfi, R., McCabe, D., Seitz, V., Imhof, A., and Pirrotta, V. 2002. Drosophila enhancer of Zeste/ESC complexes have a histone H3 methyltransferase activity that marks chromosomal Polycomb sites. *Cell* **111**(2): 185-196.
- Daujat, S., Bauer, U.M., Shah, V., Turner, B., Berger, S., and Kouzarides, T. 2002. Crosstalk between CARM1 methylation and CBP acetylation on histone H3. *Curr Biol* **12**(24): 2090-2097.
- Davey, C.A., Sargent, D.F., Luger, K., Maeder, A.W., and Richmond, T.J. 2002. Solvent mediated interactions in the structure of the nucleosome core particle at 1.9 Å resolution. *Journal of molecular biology* **319**(5): 1097-1113.
- Dou, Y., Milne, T.A., Ruthenburg, A.J., Lee, S., Lee, J.W., Verdine, G.L., Allis, C.D., and Roeder, R.G. 2006. Regulation of MLL1 H3K4 methyltransferase activity by its core components. *Nat Struct Mol Biol* **13**(8): 713-719.

- Dou, Y., Milne, T.A., Tackett, A.J., Smith, E.R., Fukuda, A., Wysocka, J., Allis, C.D., Chait, B.T., Hess, J.L., and Roeder, R.G. 2005. Physical association and coordinate function of the H3 K4 methyltransferase MLL1 and the H4 K16 acetyltransferase MOF. *Cell* **121**(6): 873-885.
- El-Andaloussi, N., Valovka, T., Toueille, M., Steinacher, R., Focke, F., Gehrig, P., Covic, M., Hassa, P.O., Schar, P., Hubscher, U., and Hottiger, M.O. 2006. Arginine methylation regulates DNA polymerase beta. *Molecular cell* **22**(1): 51-62.
- Fischle, W., Tseng, B.S., Dormann, H.L., Ueberheide, B.M., Garcia, B.A., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., Funabiki, H., and Allis, C.D. 2005. Regulation of HP1-chromatin binding by histone H3 methylation and phosphorylation. *Nature* **438**(7071): 1116-1122.
- Fischle, W., Wang, Y., Jacobs, S.A., Kim, Y., Allis, C.D., and Khorasanizadeh, S. 2003. Molecular basis for the discrimination of repressive methyl-lysine marks in histone H3 by Polycomb and HP1 chromodomains. *Genes & development* **17**(15): 1870-1881.
- Flanagan, J.F., Mi, L.Z., Chruszcz, M., Cymborowski, M., Clines, K.L., Kim, Y., Minor, W., Rastinejad, F., and Khorasanizadeh, S. 2005. Double chromodomains cooperate to recognize the methylated histone H3 tail. *Nature* **438**(7071): 1181-1185.
- Frankel, A. and Clarke, S. 2000. PRMT3 is a distinct member of the protein arginine N-methyltransferase family. Conferral of substrate specificity by a zinc-finger domain. *The Journal of biological chemistry* **275**(42): 32974-32982.
- Frankel, A., Yadav, N., Lee, J., Branscombe, T.L., Clarke, S., and Bedford, M.T. 2002. The novel human protein arginine N-methyltransferase PRMT6 is a nuclear enzyme displaying unique substrate specificity. *The Journal of biological chemistry* **277**(5): 3537-3543.
- Gary, J.D. and Clarke, S. 1998. RNA and protein interactions modulated by protein arginine methylation. *Progress in nucleic acid research and molecular biology* **61**: 65-131.
- Gary, J.D., Lin, W.J., Yang, M.C., Herschman, H.R., and Clarke, S. 1996. The predominant protein-arginine methyltransferase from *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry* **271**(21): 12585-12594.
- Gregorieff, A. and Clevers, H. 2005. Wnt signaling in the intestinal epithelium: from endoderm to cancer. *Genes & development* **19**(8): 877-890.
- Guccione, E., Bassi, C., Casadio, F., Martinato, F., Cesaroni, M., Schuchlantz, H., Luscher, B., and Amati, B. 2007. Methylation of histone H3R2 by PRMT6 and H3K4 by an MLL complex are mutually exclusive. *Nature* **449**(7164): 933-937.
- Guccione, E., Martinato, F., Finocchiaro, G., Luzi, L., Tizzoni, L., Dall' Olio, V., Zardo, G., Nervi, C., Bernard, L., and Amati, B. 2006. Myc-binding-site recognition in the human genome is determined by chromatin context. *Nature cell biology* **8**(7): 764-770.

- Han, Z., Guo, L., Wang, H., Shen, Y., Deng, X.W., and Chai, J. 2006. Structural basis for the specific recognition of methylated histone H3 lysine 4 by the WD-40 protein WDR5. *Molecular cell* **22**(1): 137-144.
- Hassa, P.O., Covic, M., Bedford, M.T., and Hottiger, M.O. 2008. Protein arginine methyltransferase 1 coactivates NF-kappaB-dependent gene expression synergistically with CARM1 and PARP1. *Journal of molecular biology* **377**(3): 668-678.
- Hay, R.T. 2005. SUMO: a history of modification. *Molecular cell* **18**(1): 1-12.
- He, T.C., Sparks, A.B., Rago, C., Hermeking, H., Zawel, L., da Costa, L.T., Morin, P.J., Vogelstein, B., and Kinzler, K.W. 1998. Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science (New York, NY)* **281**(5382): 1509-1512.
- Hershko, A. 2005. The ubiquitin system for protein degradation and some of its roles in the control of the cell division cycle. *Cell death and differentiation* **12**(9): 1191-1197.
- Hirota, T., Lipp, J.J., Toh, B.H., and Peters, J.M. 2005. Histone H3 serine 10 phosphorylation by Aurora B causes HP1 dissociation from heterochromatin. *Nature* **438**(7071): 1176-1180.
- Hsieh, J.J., Cheng, E.H., and Korsmeyer, S.J. 2003. Taspase1: a threonine aspartase required for cleavage of MLL and proper HOX gene expression. *Cell* **115**(3): 293-303.
- Hsu, J.Y., Sun, Z.W., Li, X., Reuben, M., Tatchell, K., Bishop, D.K., Grushcow, J.M., Brame, C.J., Caldwell, J.A., Hunt, D.F., Lin, R., Smith, M.M., and Allis, C.D. 2000. Mitotic phosphorylation of histone H3 is governed by Ipl1/aurora kinase and Glc7/PP1 phosphatase in budding yeast and nematodes. *Cell* **102**(3): 279-291.
- Hughes, R.M. and Waters, M.L. 2006. Arginine methylation in a beta-hairpin peptide: implications for Arg-pi interactions, DeltaCp(o), and the cold denatured state. *Journal of the American Chemical Society* **128**(39): 12735-12742.
- Hyllus, D., Stein, C., Schnabel, K., Schiltz, E., Imhof, A., Dou, Y., Hsieh, J., and Bauer, U.M. 2007. PRMT6-mediated methylation of R2 in histone H3 antagonizes H3 K4 trimethylation. *Genes & development* **21**(24): 3369-3380.
- Invernizzi, C.F., Xie, B., Frankel, F.A., Feldhammer, M., Roy, B.B., Richard, S., and Wainberg, M.A. 2007. Arginine methylation of the HIV-1 nucleocapsid protein results in its diminished function. *AIDS (London, England)* **21**(7): 795-805.
- Invernizzi, C.F., Xie, B., Richard, S., and Wainberg, M.A. 2006. PRMT6 diminishes HIV-1 Rev binding to and export of viral RNA. *Retrovirology* **3**: 93.
- Jelinic, P., Stehle, J.C., and Shaw, P. 2006. The testis-specific factor CTCFL cooperates with the protein methyltransferase PRMT7 in H19 imprinting control region methylation. *PLoS Biol* **4**(11): e355.
- Jenuwein, T. and Allis, C.D. 2001. Translating the histone code. *Science (New York, NY)* **293**(5532): 1074-1080.
- Jenuwein, T., Laible, G., Dorn, R., and Reuter, G. 1998. SET domain proteins modulate chromatin domains in eu- and heterochromatin. *Cell Mol Life Sci* **54**(1): 80-93.

- Kim, J., Lee, J., Yadav, N., Wu, Q., Carter, C., Richard, S., Richie, E., and Bedford, M.T. 2004. Loss of CARM1 results in hypomethylation of thymocyte cyclic AMP-regulated phosphoprotein and deregulated early T cell development. *The Journal of biological chemistry* **279**(24): 25339-25344.
- Kim, S., Merrill, B.M., Rajpurohit, R., Kumar, A., Stone, K.L., Papov, V.V., Schneiders, J.M., Szer, W., Wilson, S.H., Paik, W.K., and Williams, K.R. 1997. Identification of N(G)-methylarginine residues in human heterogeneous RNP protein A1: Phe/Gly-Gly-Gly-Arg-Gly-Gly-Gly/Phe is a preferred recognition motif. *Biochemistry* **36**(17): 5185-5192.
- Kirmizis, A., Santos-Rosa, H., Penkett, C.J., Singer, M.A., Vermeulen, M., Mann, M., Bahler, J., Green, R.D., and Kouzarides, T. 2007. Arginine methylation at histone H3R2 controls deposition of H3K4 trimethylation. *Nature* **449**(7164): 928-932.
- Kleinschmidt, M.A., Streubel, G., Samans, B., Krause, M., and Bauer, U.M. 2008. The protein arginine methyltransferases CARM1 and PRMT1 cooperate in gene regulation. *Nucleic acids research*.
- Kornberg, R.D. and Lorch, Y. 1999. Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome. *Cell* **98**(3): 285-294.
- Krivtsov, A.V. and Armstrong, S.A. 2007. MLL translocations, histone modifications and leukaemia stem-cell development. *Nat Rev Cancer* **7**(11): 823-833.
- Kuzmichev, A., Jenuwein, T., Tempst, P., and Reinberg, D. 2004. Different EZH2-containing complexes target methylation of histone H1 or nucleosomal histone H3. *Molecular cell* **14**(2): 183-193.
- Kzhyshkowska, J., Schutt, H., Liss, M., Kremmer, E., Stauber, R., Wolf, H., and Dobner, T. 2001. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein E1B-AP5 is methylated in its Arg-Gly-Gly (RGG) box and interacts with human arginine methyltransferase HRMT1L1. *The Biochemical journal* **358**(Pt 2): 305-314.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**(5259): 680-685.
- Lakowski, T.M. and Frankel, A. 2008. A kinetic study of human protein arginine N-methyltransferase 6 reveals a distributive mechanism. *The Journal of biological chemistry* **283**(15): 10015-10025.
- Le Guezennec, X., Vermeulen, M., Brinkman, A.B., Hoeijmakers, W.A., Cohen, A., Lasonder, E., and Stunnenberg, H.G. 2006. MBD2/NuRD and MBD3/NuRD, two distinct complexes with different biochemical and functional properties. *Molecular and cellular biology* **26**(3): 843-851.
- Lee, H.W., Kim, S., and Paik, W.K. 1977. S-adenosylmethionine: protein-arginine methyltransferase. Purification and mechanism of the enzyme. *Biochemistry* **16**(1): 78-85.
- Lee, J., Sayegh, J., Daniel, J., Clarke, S., and Bedford, M.T. 2005a. PRMT8, a new membrane-bound tissue-specific member of the protein arginine methyltransferase family. *The Journal of biological chemistry* **280**(38): 32890-32896.

- Lee, J.H., Cook, J.R., Yang, Z.H., Mirochnitchenko, O., Gunderson, S.I., Felix, A.M., Herth, N., Hoffmann, R., and Pestka, S. 2005b. PRMT7, a new protein arginine methyltransferase that synthesizes symmetric dimethylarginine. *The Journal of biological chemistry* **280**(5): 3656-3664.
- Lee, J.H. and Skalnik, D.G. 2005. CpG-binding protein (CXXC finger protein 1) is a component of the mammalian Set1 histone H3-Lys4 methyltransferase complex, the analogue of the yeast Set1/COMPASS complex. *The Journal of biological chemistry* **280**(50): 41725-41731.
- Lee, T.I., Jenner, R.G., Boyer, L.A., Guenther, M.G., Levine, S.S., Kumar, R.M., Chevalier, B., Johnstone, S.E., Cole, M.F., Isono, K., Koseki, H., Fuchikami, T., Abe, K., Murray, H.L., Zucker, J.P., Yuan, B., Bell, G.W., Herbolsheimer, E., Hannett, N.M., Sun, K., Odom, D.T., Otte, A.P., Volkert, T.L., Bartel, D.P., Melton, D.A., Gifford, D.K., Jaenisch, R., and Young, R.A. 2006. Control of developmental regulators by Polycomb in human embryonic stem cells. *Cell* **125**(2): 301-313.
- Lee, V.M. and Andrews, P.W. 1986. Differentiation of NTERA-2 clonal human embryonal carcinoma cells into neurons involves the induction of all three neurofilament proteins. *J Neurosci* **6**(2): 514-521.
- Li, H., Ilin, S., Wang, W., Duncan, E.M., Wysocka, J., Allis, C.D., and Patel, D.J. 2006. Molecular basis for site-specific read-out of histone H3K4me3 by the BPTF PHD finger of NURF. *Nature* **442**(7098): 91-95.
- Lin, W.J., Gary, J.D., Yang, M.C., Clarke, S., and Herschman, H.R. 1996. The mammalian immediate-early TIS21 protein and the leukemia-associated BTG1 protein interact with a protein-arginine N-methyltransferase. *The Journal of biological chemistry* **271**(25): 15034-15044.
- Lo, W.S., Trievel, R.C., Rojas, J.R., Duggan, L., Hsu, J.Y., Allis, C.D., Marmorstein, R., and Berger, S.L. 2000. Phosphorylation of serine 10 in histone H3 is functionally linked in vitro and in vivo to Gcn5-mediated acetylation at lysine 14. *Molecular cell* **5**(6): 917-926.
- Luger, K. and Richmond, T.J. 1998. DNA binding within the nucleosome core. *Current opinion in structural biology* **8**(1): 33-40.
- Milne, T.A., Briggs, S.D., Brock, H.W., Martin, M.E., Gibbs, D., Allis, C.D., and Hess, J.L. 2002. MLL targets SET domain methyltransferase activity to Hox gene promoters. *Molecular cell* **10**(5): 1107-1117.
- Miranda, T.B., Miranda, M., Frankel, A., and Clarke, S. 2004. PRMT7 is a member of the protein arginine methyltransferase family with a distinct substrate specificity. *The Journal of biological chemistry* **279**(22): 22902-22907.
- Miranda, T.B., Webb, K.J., Edberg, D.D., Reeves, R., and Clarke, S. 2005. Protein arginine methyltransferase 6 specifically methylates the nonhistone chromatin protein HMGA1a. *Biochemical and biophysical research communications* **336**(3): 831-835.
- Najbauer, J., Johnson, B.A., Young, A.L., and Aswad, D.W. 1993. Peptides with sequences similar to glycine, arginine-rich motifs in proteins interacting with

- RNA are efficiently recognized by methyltransferase(s) modifying arginine in numerous proteins. *The Journal of biological chemistry* **268**(14): 10501-10509.
- Nishioka, K., Chuikov, S., Sarma, K., Erdjument-Bromage, H., Allis, C.D., Tempst, P., and Reinberg, D. 2002. Set9, a novel histone H3 methyltransferase that facilitates transcription by precluding histone tail modifications required for heterochromatin formation. *Genes & development* **16**(4): 479-489.
- Ong, S.E., Foster, L.J., and Mann, M. 2003. Mass spectrometric-based approaches in quantitative proteomics. *Methods (San Diego, Calif)* **29**(2): 124-130.
- Ong, S.E., Mittler, G., and Mann, M. 2004. Identifying and quantifying in vivo methylation sites by heavy methyl SILAC. *Nat Methods* **1**(2): 119-126.
- Paik, W.K. and Kim, S. 1967. Enzymatic methylation of protein fractions from calf thymus nuclei. *Biochemical and biophysical research communications* **29**(1): 14-20.
- Pal, S. and Sif, S. 2007. Interplay between chromatin remodelers and protein arginine methyltransferases. *J Cell Physiol* **213**(2): 306-315.
- Pal, S., Vishwanath, S.N., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Sif, S. 2004. Human SWI/SNF-associated PRMT5 methylates histone H3 arginine 8 and negatively regulates expression of ST7 and NM23 tumor suppressor genes. *Molecular and cellular biology* **24**(21): 9630-9645.
- Pal, S., Yun, R., Datta, A., Lacomis, L., Erdjument-Bromage, H., Kumar, J., Tempst, P., and Sif, S. 2003. mSin3A/histone deacetylase 2- and PRMT5-containing Brg1 complex is involved in transcriptional repression of the Myc target gene cad. *Molecular and cellular biology* **23**(21): 7475-7487.
- Pasini, D., Bracken, A.P., Jensen, M.R., Lazzerini Denchi, E., and Helin, K. 2004. Suz12 is essential for mouse development and for EZH2 histone methyltransferase activity. *The EMBO journal* **23**(20): 4061-4071.
- Passeri, D., Marcucci, A., Rizzo, G., Billi, M., Panigada, M., Leonardi, L., Tirone, F., and Grignani, F. 2006. Btg2 enhances retinoic acid-induced differentiation by modulating histone H4 methylation and acetylation. *Molecular and cellular biology* **26**(13): 5023-5032.
- Pawlak, M.R., Scherer, C.A., Chen, J., Roshon, M.J., and Ruley, H.E. 2000. Arginine N-methyltransferase 1 is required for early postimplantation mouse development, but cells deficient in the enzyme are viable. *Molecular and cellular biology* **20**(13): 4859-4869.
- Pawson, T. 2004. Specificity in signal transduction: from phosphotyrosine-SH2 domain interactions to complex cellular systems. *Cell* **116**(2): 191-203.
- Pazin, M.J. and Kadonaga, J.T. 1997. What's up and down with histone deacetylation and transcription? *Cell* **89**(3): 325-328.
- Pei, Y., Niu, L., Lu, F., Liu, C., Zhai, J., Kong, X., and Cao, X. 2007. Mutations in the Type II protein arginine methyltransferase AtPRMT5 result in pleiotropic developmental defects in Arabidopsis. *Plant physiology* **144**(4): 1913-1923.
- Qian, Y.W. and Lee, E.Y. 1995. Dual retinoblastoma-binding proteins with properties related to a negative regulator of ras in yeast. *The Journal of biological chemistry* **270**(43): 25507-25513.

- Rea, S., Eisenhaber, F., O'Carroll, D., Strahl, B.D., Sun, Z.W., Schmid, M., Opravil, S., Mechtler, K., Ponting, C.P., Allis, C.D., and Jenuwein, T. 2000. Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature* **406**(6796): 593-599.
- Reeves, R. and Beckerbauer, L. 2001. HMGI/Y proteins: flexible regulators of transcription and chromatin structure. *Biochimica et biophysica acta* **1519**(1-2): 13-29.
- Rezai-Zadeh, N., Zhang, X., Namour, F., Fejer, G., Wen, Y.D., Yao, Y.L., Gyory, I., Wright, K., and Seto, E. 2003. Targeted recruitment of a histone H4-specific methyltransferase by the transcription factor YY1. *Genes & development* **17**(8): 1019-1029.
- Rozenblatt-Rosen, O., Rozovskaia, T., Burakov, D., Sedkov, Y., Tillib, S., Blechman, J., Nakamura, T., Croce, C.M., Mazo, A., and Canaani, E. 1998. The C-terminal SET domains of ALL-1 and TRITHORAX interact with the INI1 and SNR1 proteins, components of the SWI/SNF complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**(8): 4152-4157.
- Ruthenburg, A.J., Allis, C.D., and Wysocka, J. 2007. Methylation of lysine 4 on histone H3: intricacy of writing and reading a single epigenetic mark. *Molecular cell* **25**(1): 15-30.
- Ruthenburg, A.J., Wang, W., Graybosch, D.M., Li, H., Allis, C.D., Patel, D.J., and Verdine, G.L. 2006. Histone H3 recognition and presentation by the WDR5 module of the MLL1 complex. *Nat Struct Mol Biol* **13**(8): 704-712.
- Schneider, R., Bannister, A.J., Myers, F.A., Thorne, A.W., Crane-Robinson, C., and Kouzarides, T. 2004. Histone H3 lysine 4 methylation patterns in higher eukaryotic genes. *Nature cell biology* **6**(1): 73-77.
- Schuettengruber, B., Chourrout, D., Vervoort, M., Leblanc, B., and Cavalli, G. 2007. Genome regulation by polycomb and trithorax proteins. *Cell* **128**(4): 735-745.
- Schurter, B.T., Koh, S.S., Chen, D., Bunick, G.J., Harp, J.M., Hanson, B.L., Henschen-Edman, A., Mackay, D.R., Stallcup, M.R., and Aswad, D.W. 2001. Methylation of histone H3 by coactivator-associated arginine methyltransferase 1. *Biochemistry* **40**(19): 5747-5756.
- Schwartz, Y.B. and Pirrotta, V. 2007. Polycomb silencing mechanisms and the management of genomic programmes. *Nat Rev Genet* **8**(1): 9-22.
- Scott, H.S., Antonarakis, S.E., Lalioti, M.D., Rossier, C., Silver, P.A., and Henry, M.F. 1998. Identification and characterization of two putative human arginine methyltransferases (HRMT1L1 and HRMT1L2). *Genomics* **48**(3): 330-340.
- Seet, B.T., Dikic, I., Zhou, M.M., and Pawson, T. 2006. Reading protein modifications with interaction domains. *Nature reviews* **7**(7): 473-483.
- Sgarra, R., Lee, J., Tessari, M.A., Altamura, S., Spolaore, B., Giancotti, V., Bedford, M.T., and Manfioletti, G. 2006. The AT-hook of the chromatin architectural transcription factor high mobility group A1a is arginine-methylated by protein arginine methyltransferase 6. *The Journal of biological chemistry* **281**(7): 3764-3772.

- Shi, Y., Lan, F., Matson, C., Mulligan, P., Whetstine, J.R., Cole, P.A., Casero, R.A., and Shi, Y. 2004. Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell* **119**(7): 941-953.
- Sierra, J., Yoshida, T., Joazeiro, C.A., and Jones, K.A. 2006. The APC tumor suppressor counteracts beta-catenin activation and H3K4 methylation at Wnt target genes. *Genes & development* **20**(5): 586-600.
- Strahl, B.D. and Allis, C.D. 2000. The language of covalent histone modifications. *Nature* **403**(6765): 41-45.
- Strahl, B.D., Briggs, S.D., Brame, C.J., Caldwell, J.A., Koh, S.S., Ma, H., Cook, R.G., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., Stallcup, M.R., and Allis, C.D. 2001. Methylation of histone H4 at arginine 3 occurs in vivo and is mediated by the nuclear receptor coactivator PRMT1. *Curr Biol* **11**(12): 996-1000.
- Tang, J., Frankel, A., Cook, R.J., Kim, S., Paik, W.K., Williams, K.R., Clarke, S., and Herschman, H.R. 2000. PRMT1 is the predominant type I protein arginine methyltransferase in mammalian cells. *The Journal of biological chemistry* **275**(11): 7723-7730.
- Tang, J., Gary, J.D., Clarke, S., and Herschman, H.R. 1998. PRMT 3, a type I protein arginine N-methyltransferase that differs from PRMT1 in its oligomerization, subcellular localization, substrate specificity, and regulation. *The Journal of biological chemistry* **273**(27): 16935-16945.
- Torres-Padilla, M.E., Parfitt, D.E., Kouzarides, T., and Zernicka-Goetz, M. 2007. Histone arginine methylation regulates pluripotency in the early mouse embryo. *Nature* **445**(7124): 214-218.
- Turner, B.M. 2002. Cellular memory and the histone code. *Cell* **111**(3): 285-291.
- Vermeulen, M., Mulder, K.W., Denissov, S., Pijnappel, W.W., van Schaik, F.M., Varier, R.A., Baltissen, M.P., Stunnenberg, H.G., Mann, M., and Timmers, H.T. 2007. Selective anchoring of TFIID to nucleosomes by trimethylation of histone H3 lysine 4. *Cell* **131**(1): 58-69.
- Verreault, A., Kaufman, P.D., Kobayashi, R., and Stillman, B. 1998. Nucleosomal DNA regulates the core-histone-binding subunit of the human Hat1 acetyltransferase. *Curr Biol* **8**(2): 96-108.
- Wagner, S., Weber, S., Kleinschmidt, M.A., Nagata, K., and Bauer, U.M. 2006. SET-mediated promoter hypoacetylation is a prerequisite for coactivation of the estrogen-responsive pS2 gene by PRMT1. *The Journal of biological chemistry* **281**(37): 27242-27250.
- Wang, H., Huang, Z.Q., Xia, L., Feng, Q., Erdjument-Bromage, H., Strahl, B.D., Briggs, S.D., Allis, C.D., Wong, J., Tempst, P., and Zhang, Y. 2001. Methylation of histone H4 at arginine 3 facilitating transcriptional activation by nuclear hormone receptor. *Science (New York, NY)* **293**(5531): 853-857.
- Weber, S., Maass, F., Schuermann, M., Krause, E., Suske, G., and Bauer, U.M. 2009. PRMT1-mediated arginine methylation of PIAS1 regulates STAT1 signaling. *Genes & development* **23**(1): 118-132.

- Wooderchak, W.L., Zang, T., Zhou, Z.S., Acuna, M., Tahara, S.M., and Hevel, J.M. 2008. Substrate profiling of PRMT1 reveals amino acid sequences that extend beyond the "RGG" paradigm. *Biochemistry* **47**(36): 9456-9466.
- Wysocka, J., Myers, M.P., Laherty, C.D., Eisenman, R.N., and Herr, W. 2003. Human Sin3 deacetylase and trithorax-related Set1/Ash2 histone H3-K4 methyltransferase are tethered together selectively by the cell-proliferation factor HCF-1. *Genes & development* **17**(7): 896-911.
- Wysocka, J., Swigut, T., Milne, T.A., Dou, Y., Zhang, X., Burlingame, A.L., Roeder, R.G., Brivanlou, A.H., and Allis, C.D. 2005. WDR5 associates with histone H3 methylated at K4 and is essential for H3 K4 methylation and vertebrate development. *Cell* **121**(6): 859-872.
- Wysocka, J., Swigut, T., Xiao, H., Milne, T.A., Kwon, S.Y., Landry, J., Kauer, M., Tackett, A.J., Chait, B.T., Badenhorst, P., Wu, C., and Allis, C.D. 2006. A PHD finger of NURF couples histone H3 lysine 4 trimethylation with chromatin remodelling. *Nature* **442**(7098): 86-90.
- Xiao, B., Jing, C., Wilson, J.R., Walker, P.A., Vasisht, N., Kelly, G., Howell, S., Taylor, I.A., Blackburn, G.M., and Gamblin, S.J. 2003. Structure and catalytic mechanism of the human histone methyltransferase SET7/9. *Nature* **421**(6923): 652-656.
- Xie, B., Invernizzi, C.F., Richard, S., and Wainberg, M.A. 2007. Arginine methylation of the human immunodeficiency virus type 1 Tat protein by PRMT6 negatively affects Tat Interactions with both cyclin T1 and the Tat transactivation region. *Journal of virology* **81**(8): 4226-4234.
- Xing, Y., Clements, W.K., Kimelman, D., and Xu, W. 2003. Crystal structure of a beta-catenin/axin complex suggests a mechanism for the beta-catenin destruction complex. *Genes & development* **17**(22): 2753-2764.
- Xu, W., Cho, H., Kadam, S., Banayo, E.M., Anderson, S., Yates, J.R., 3rd, Emerson, B.M., and Evans, R.M. 2004. A methylation-mediator complex in hormone signaling. *Genes & development* **18**(2): 144-156.
- Yadav, N., Lee, J., Kim, J., Shen, J., Hu, M.C., Aldaz, C.M., and Bedford, M.T. 2003. Specific protein methylation defects and gene expression perturbations in coactivator-associated arginine methyltransferase 1-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**(11): 6464-6468.
- Yokoyama, A., Kitabayashi, I., Ayton, P.M., Cleary, M.L., and Ohki, M. 2002. Leukemia proto-oncoprotein MLL is proteolytically processed into 2 fragments with opposite transcriptional properties. *Blood* **100**(10): 3710-3718.
- Yue, W.W., Hassler, M., Roe, S.M., Thompson-Vale, V., and Pearl, L.H. 2007. Insights into histone code syntax from structural and biochemical studies of CARM1 methyltransferase. *The EMBO journal* **26**(20): 4402-4412.
- Zhang, W., Bone, J.R., Edmondson, D.G., Turner, B.M., and Roth, S.Y. 1998a. Essential and redundant functions of histone acetylation revealed by mutation of target lysines and loss of the Gcn5p acetyltransferase. *The EMBO journal* **17**(11): 3155-3167.

- Zhang, X. and Cheng, X. 2003. Structure of the predominant protein arginine methyltransferase PRMT1 and analysis of its binding to substrate peptides. *Structure* **11**(5): 509-520.
- Zhang, X., Zhou, L., and Cheng, X. 2000. Crystal structure of the conserved core of protein arginine methyltransferase PRMT3. *The EMBO journal* **19**(14): 3509-3519.
- Zhang, Y., LeRoy, G., Seelig, H.P., Lane, W.S., and Reinberg, D. 1998b. The dermatomyositis-specific autoantigen Mi2 is a component of a complex containing histone deacetylase and nucleosome remodeling activities. *Cell* **95**(2): 279-289.

10 Anhang

10.1 Lebenslauf

Dawin Michael Hyllus

geboren am 10.04.1977

in Frankenthal/Pfalz

ledig

Schulausbildung

1987 – 1996

Albert - Einstein - Gymnasium, Frankenthal/Pfalz

Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife

Zivildienst

1996 – 1997

Zivildienst beim Malteser Hilfsdienst e. V.

Frankenthal/Pfalz

Studium

Okt.1997 – Okt.2003

Studium der Diplom-Chemie

an der Technischen Universität Kaiserslautern

Mär.2001 – Jun.2001

Auslandsaufenthalt an der Universidad de Oviedo,

Spanien im Arbeitskreis von Prof. Dr. Jose Barluenga

Apr.2002 – Apr.2003

Diplomarbeit im Arbeitskreis von

Prof. Dr. Pia Vogel, TU Kaiserslautern

Thema: Die F₁-ATPase als Molekularer Motor

Apr.2003

Erwerb des Diplom im Fach Diplom-Chemie

seit Okt. 2005

Promotion in der Arbeitsgruppe von

Prof. Dr. Uta-Maria Bauer,

Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung,

betreut von Prof. Dr. Lars-Oliver Essen

Philips-Universität Marburg

Thema: Funktionelle Charakterisierung der

Arginin Methyltransferase PRMT6

Marburg, den _____

Dawin Michael Hyllus

10.2 Danksagung

Hiermit danke ich Frau Prof. Dr. Uta-Maria Bauer für die Bereitstellung des Themas und die Betreuung während der Durchführung dieser Arbeit.

Ich danke ebenfalls Herrn Prof. Dr. Lars-Oliver Essen für die akademische Betreuung dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Frau Claudia Stein und Frau Gundula Streubel für deren stetige Bereitschaft mir mit Rat und Tat zur Seite zu stehen.

Ich danke auch Herrn Dr. Emile Schiltz, Herrn Prof. Dr. Axel Imhof sowie Herrn Dr. Eberhard Krause für die Durchführung von Spezialanalysen welche mir wertvolle Erkenntnisse lieferten.

Außerdem möchte ich mich bei den ehemaligen und derzeitigen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Bauer Susanne Weber, Kristin Schnabel, Florian Maas, Sophia Teichmann, Marc Zeller, Markus Kleinschmidt, Inge Sprenger und Karin Theis für die akademische Unterstützung, eine angenehme und erfrischende Atmosphäre im Labor sowie endlose fachliche, wie nicht-fachliche Diskussionen in der Kaffeeküche bedanken.

Desweiteren danke ich der Arbeitsgruppe Brehm und vor allem Magdalena Murawska für die Bereitstellung ihrer Materialien.

Letztlich möchte ich mich noch bei meinen Eltern bedanken, ohne deren gänzlich nicht-akademische Unterstützung das alles nicht möglich gewesen wäre.

10.3 Ehrenwörtliche Erklärung

Ich versichere, dass ich die dem Fachbereich Chemie der Philipps-Universität Marburg vorgelegte Dissertation mit dem Thema „Funktionelle Charaktersistierung der Arginin Methyltransferase PRMT6“ am Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung unter Leitung von Prof. Dr. Uta-Maria Bauer selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, den _____

Dawin Michael Hyllus

10.4 Publikation

Teile der vorliegenden Arbeit wurden in folgender wissenschaftlicher Zeitschrift veröffentlicht:

Hyllus, D., Stein, C., Schnabel, K., Schiltz, E., Imhof, A., Dou, Y., Hsieh, J., and Bauer, U.M.

PRMT6-mediated methylation of R2 in histone H3 antagonizes H3 K4 trimethylation. *Genes & development* **21**(24): 3369-3380. 2007